



Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE COORDINAN LA ACTIVIDAD
DE LOS CENTROS ORGANIZADORES DE MICROTÚBULOS
DE LAS CÉLULAS ANIMALES**

**Pablo Gandolfo Domínguez
Sevilla, 2019**

Dra. Rosa M. Ríos Sánchez, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y miembro del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)

Dra. María de la Paz Gavilán Dorronzoro, investigadora asociada en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)

CERTIFICAN :

Que el trabajo titulado **“Estudio de los mecanismos que coordinan la actividad de los centros organizadores de microtúbulos de las células animales”** presentado por el licenciado **Pablo Gandolfo Domínguez**, para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizado bajo su supervisión en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea defendido ante el tribunal correspondiente

Y, para que conste a los efectos oportunos, expiden y firman el presente certificado.

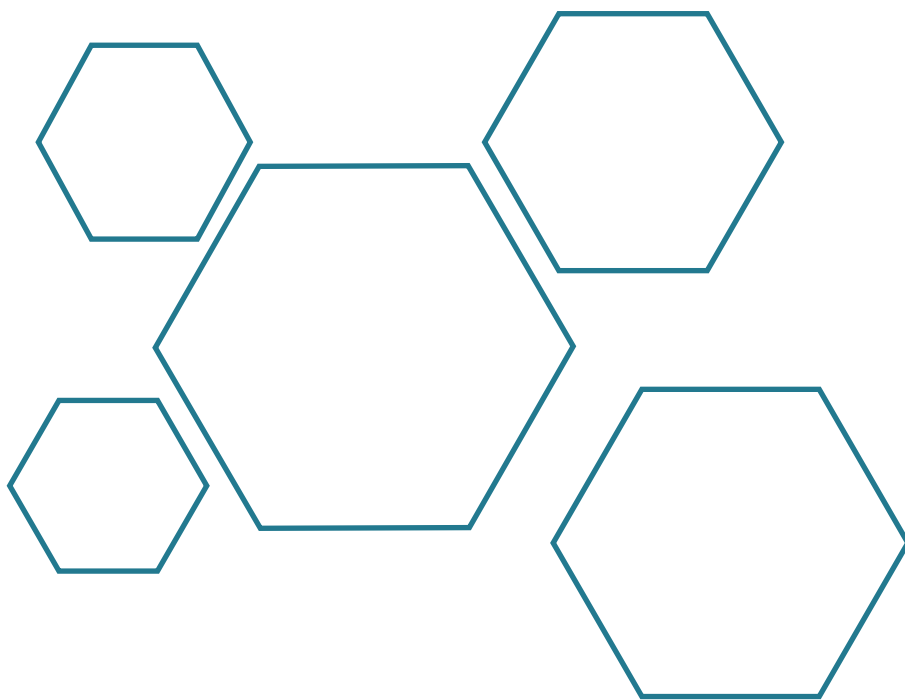
Fdo.
Dra. Rosa M. Ríos Sánchez
Directora

Fdo.
Dra. María de la Paz Gavilán Dorronzoro
Co-directora

Fdo.
Dr. Rafael Fernández-Chacón
Tutor de la Universidad de Sevilla

Fdo.
Pablo Gandolfo Domínguez
Doctorando

ÍNDICE



ABREVIATURAS	1
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN.....	13
I. EL CITOESQUELETO MICROTUBULAR.....	15
1.1. Estructura y dinámica de los microtúbulos.	
II. CENTROS ORGANIZADORES DE MICROTÚBULOS (MTOCs).....	20
2.1. El centrosoma.	
2.1.1. Estructura del centriolo.	
2.1.2. Ciclo de duplicación del centriolo.	
2.1.2.1. Centrinona.	
2.1.3. Estructura y dinámica del PCM.	
2.2. Mecanismos de nucleación de microtúbulos.	
2.3. El Aparato de Golgi (AG).	
2.3.1. El Aparato de Golgi como MTOC.	
2.3.1.1. Funciones de los microtúbulos nucleados desde el Aparato de Golgi	
2.3.1.2. Nucleación de microtúbulos desde el Aparato de Golgi en células diferenciadas.	
2.4. Otros MTOCs celulares.	
2.4.1. La envuelta nuclear.	
2.4.2. La cromatina y los cinetocoros.	
2.4.3. La superficie de otros microtúbulos pre-existentes.	
2.4.4. Sitios asociados a la membrana plasmática.	
III. PRINCIPALES RECLUTADORES DE γTuRCs.....	49
3.1. AKAP450	
3.1.1. Características y funciones de AKAP450.	
3.2. Pericentrina	
3.2.1. Características y funciones de Pericentrina.	
3.3. CDK5RAP2	
3.3.1. Características y funciones de CDK5RAP2.	
3.4. Miomegalina	
3.4.1 Características y funciones de Miomegalina (MMG8)	
3.5. CEP192	
3.5.1. Características y funciones de CEP192.	
IV. ENFERMEDADES HUMANAS Y DIANAS TERAPÉUTICAS.....	56

OBJETIVOS.....	59
RESULTADOS.....	63
I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS BIOLÓGICAS NECESARIAS PARA EL DESARROLLO DEL ESTUDIO. LÍNEAS CELULARES hTERT-RPE1 KNOCK-OUT GENERADAS MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE CRISPR/CAS9.....	65
1.1. Generación del plásmido pIFA1 y diseño de ARNs guías.	
1.2. Generación y caracterización de las líneas celulares hTERT-RPE1 knock-out.	
1.2.1. Análisis de las mutaciones producidas en el ADN de las líneas celulares knock-out.	
1.2.2. Análisis a nivel de proteínas.	
1.2.2.1. Caracterización y generación de anticuerpos.	
1.2.2.2. Caracterización de los diferentes clones knock-out.	
1.2.2.3. Caracterización de la estabilidad de los complejos proteicos.	
II. ANÁLISIS DE LA NUCLEACIÓN DE MICROTÚBULOS DESDE EL CENTROSOMA Y EL APARATO DE GOLGI EN INTERFASE.....	79
2.1. Papel de los principales reclutadores de γ TURCs en la nucleación de MTs.	
2.1.1. Papel de los factores de unión a γ TURCs en el centrosoma.	
2.1.1.1. Papel de AKAP450.	
2.1.1.2. Papel de PCNT y CDK5RAP2.	
2.1.1.3. Otras proteínas reclutadoras de γ TuRCs. Papel de CEP192.	
2.1.2. Papel de los factores de unión a γ TURCs en el AG.	
2.2. Distribución intracelular de los distintos complejos reclutadores de γ TuRCs.	
2.2.1. Dinámica de los complejos en el Centrosoma.	
2.2.2. Dinámica de los complejos en el AG.	
III. ANÁLISIS DE LA AUSENCIA DEL CENTROSOMA EN LA ACTIVIDAD DE OTROS MTOCs.....	95
3.1. Papel del centrosoma en la nucleación de MTs desde el AG.	
3.2. Reclutamiento de γ TuRCs al AG en ausencia del centrosoma.	
3.3. Formación de microtúbulos en ausencia de nucleación asociada al AG y al centrosoma.	
3.3.1. Caracterización de los MTOCs citoplásmicos.	
IV. EFECTO DE LOS CAMBIOS EN LA DINÁMICA DE NUCLEACIÓN DESDE LOS DIFERENTES MTOCs EN LA ARQUITECTURA GLOBAL DEL CITOESQUELETO DE MICROTÚBULOS.....	113
4.1. Repercusión de la jerarquía existente en la organización de los diferentes MTOCs sobre la red global del citoesqueleto de microtúbulos.	

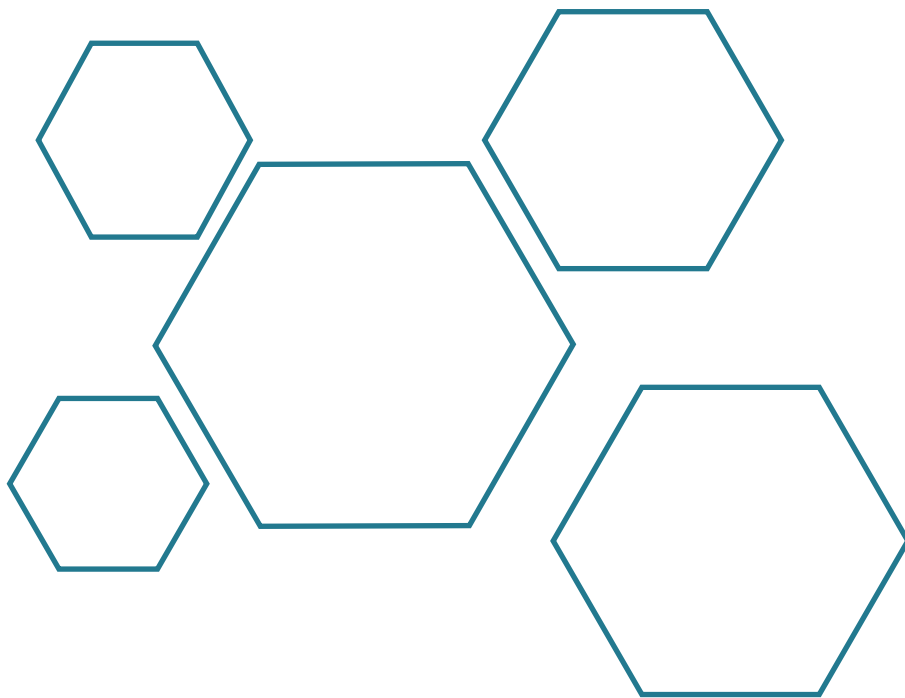
DISCUSIÓN.....	121
CONCLUSIONES.....	133
MATERIALES Y MÉTODOS.....	137
MATERIALES.....	139
1. Líneas celulares.	
2. Reactivos.	
3. Anticuerpos	
3.1. Anticuerpos primarios.	
3.2. Anticuerpos secundarios.	
4. Plásmidos.	
MÉTODOS.....	146
5. Cultivos celulares	
6. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.	
6.1. ADN.	
6.1.1. Separación de fragmentos de ADN: Electroforesis de ADN.	
6.1.2. Purificación de plásmidos de bacterias.	
6.1.3. Purificación de ADN genómico.	
6.1.4. Amplificación de secuencias de ADN: PCRs.	
6.1.5. Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.	
6.1.6. Digestión y ligación de fragmentos de ADN.	
6.1.7. Transformación de ADN.	
6.1.8. Secuenciación.	
6.2. ARN.	
6.2.1. Purificación y aislamiento de moléculas de ARN.	
6.2.2. Obtención de ADN complementario (cDNA).	
6.2.3. PCRs a tiempo real o cuantitativas (qPCR).	
7. Análisis de proteínas.	
7.1. Purificación y aislamiento de proteínas.	
7.2. Cuantificación de proteínas por el método Bradford.	
7.3. Electroforesis de proteínas en gel de bis-acrilamida e inmunoblot (WB).	
7.4. Ensayos de Inmunoprecipitación.	
8. Generación de dos anticuerpos policlonales frente a CDK5Rap2.	
9. Técnicas de Inmunocitoquímica.	
9.1. Inmunofluorescencia indirecta (IF) de monocapas de células adheridas a cubreobjetos.	
9.2. Cultivo de células sobre cubreobjetos <i>CYTOOchips</i> .	
10. Transformación transitoria de moléculas de ADN.	
10.1. Lipofección.	

- 10.2. Electroporación.
- 11. Inhibición de la expresión de proteínas.
 - 11.1. Inhibición a nivel de ARNm: ARN de interferencia (siRNA).
 - 11.2. Inhibición a nivel de ADN: Generación de células hTERT-RPE1 mutantes para akap450, cdk5rap2 y/o pcnt y cep192 mediante la técnica CRISPR/Cas9.
- 12. FRAP (fluorescence recovery after photobleaching)
- 13. Ensayo de nucleación de microtúbulos: Ensayos de repolimerización.
- 14. Análisis del ciclo y volumen celular por citometría de flujo.
- 15. Microscopía.
 - 15.1. Microscopia de Epifluorescencia.
 - 15.1.1. Microscopio de fluorescencia Leica AF6000.
 - 15.1.2. Microscopio de fluorescencia Zeiss Apotome.
 - 15.1.3. Microscopio automático de fluorescencia NIKON.
 - 15.2. Microscopia confocal.
- 16. Análisis de imágenes.
 - 16.1. Análisis de la intensidad de fluorescencia de distintas proteínas en el centrosoma.
 - 16.2. Análisis de la nucleación de MTs desde el centrosoma.
 - 16.3. Análisis de la nucleación de MTs desde el AG.
 - 16.4. Análisis de colocalización de proteínas.
 - 16.4.1. Experimentos sin centrinona.
 - 16.4.2. Experimentos con centrinona.
 - 16.5. Análisis de la intensidad total de microtúbulos.
 - 16.6. Análisis estadístico.

BIBLIOGRAFÍA..... 165

ANEXO.....183

ABREVIATURAS



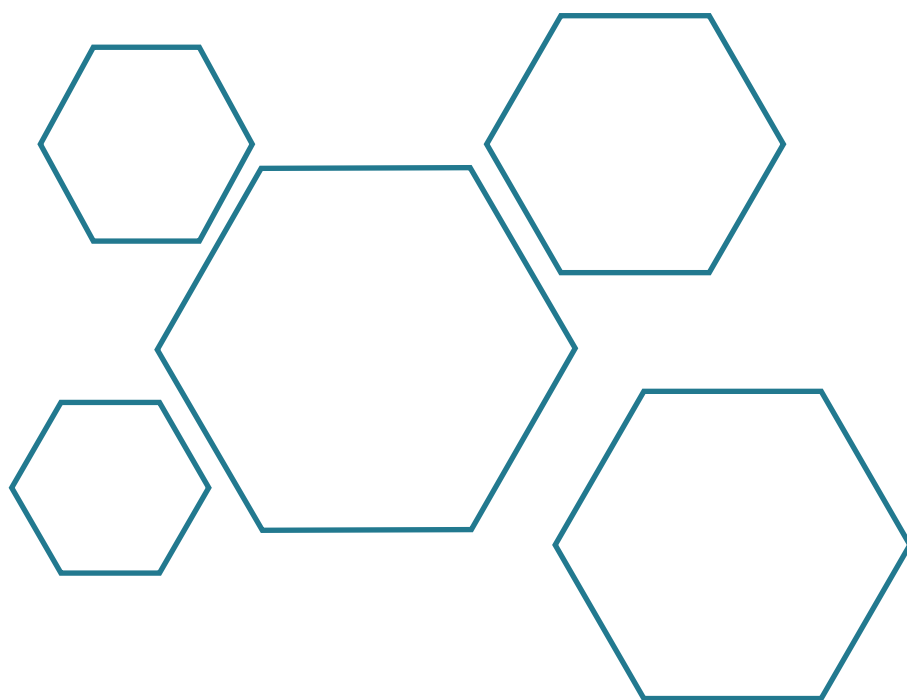
AA	Aminoácidos
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribuncleico
AG	Aparato de Golgi
AKAP450	<i>A-Kinase anchoring protein 450</i>
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Ampicilina'	Ampicilina resistente
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	Ácido ribonucleico guía
Aurora A	Aurora quinasa A
Aurora B	Aurora quinasa B
BUBR1	<i>Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta</i>
CAP350	<i>Centrosome-associated protein 350</i>
CAMSAP	<i>Calmodulin-regulated spectrin-associated protein</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
cDNA	Ácido desoxirribuncleico complementario
CDK1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CDK5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
CDK5R1	<i>Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit 1</i>
CDK5Rap2	<i>CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 2</i>
C.elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CEP63	<i>Centrosomal Protein 63</i>
CEP68	<i>Centrosomal Protein 68</i>
CEP97	<i>Centrosomal Protein 97</i>
CEP120	<i>Centrosomal Protein 120</i>
CEP135	<i>Centrosomal Protein 135</i>
CEP152	<i>Centrosomal Protein 152</i>
CEP192	<i>Centrosomal Protein 192</i>
CEP295	<i>Centrosomal Protein 295</i>
CGN	<i>cis-Golgi network</i>
Ch-TOG	<i>Colonic and hepatic tumor overexpressed gene protein</i>
ChK1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
CIN	<i>Chromosome instability</i>
CLASP	<i>CLIP-associating protein 2</i>

C-Nap1	<i>Centrosomal Nek2-associated protein 1</i>
CM1	<i>Cnn Motif 1</i>
CM2	<i>Cnn Motif 2</i>
CNN	Centrosomina
CP110	<i>Centriolar Coiled-Coil Protein 110</i>
CPAP	<i>Centrosomal P4.1-associated protein</i>
CPC	Complejo pasajero del cromosoma
CTR	Centrosoma
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
EB1	<i>End binding 1</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	Suero fetal bovino
FI	Fracción Insoluble
FOP	<i>FGFR1 oncogene partner</i>
FS	Fracción Soluble
FW	<i>Forward</i>
GCC185	<i>Golgi coiled-coil protein 185 kDa</i>
GCP	<i>Gamma-tubulin complex component</i>
GDP	Guanosina difosfato
GFP	Proteína fluorescente verde
GM130	<i>Golgi matrix protein 130</i>
GMAP210	<i>Golgi microtubule-associated protein 210</i>
GRIP	<i>γ-tubulin ring protein</i>
GTP	Guanosina Trifosfato
γTuNA	<i>γTuRC-mediated nucleation activator</i>
γTuRC	<i>Gamma-tubulin ring complex</i>
γTuSC	<i>Gamma-tubulin small complex</i>
HAUS	<i>homologous to augmin subunits</i>
Hice1	<i>HEC1/NDC80-interacting centrosome-associated protein 1</i>
hr	Horas
Hsp70	<i>heat shock protein 70</i>
HsSAS-6	<i>Spindle assembly abnormal protein 6 homolog</i>
hTERT-RPE1	<i>hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cell</i>
IF	Inmunofluorescencia

Ig	Inmunoglobulina
IP	Inmunoprecipitación
Kanamicina'	Kanamicina resistente
kDa	kiloDalton
KO	<i>knockout</i>
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LGALS3BP	<i>Galectin-3-binding protein</i>
LRRC45	<i>Leucine-Rich Repeat Containing Protein 45</i>
MAP	<i>Microtubule-associated protein</i>
MCPH	Microcefalia primaria autosómica recesiva
min	Minutos
MOPDII	<i>Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II</i>
MOZART	<i>Mitotic Spindle organizing protein</i>
MTA	<i>microtubule-targeting agent</i>
MTNC	<i>microtubule nucleation center</i>
Mto1/2	<i>mitochondrial tRNA translation optimization 1/2</i>
MTOC	Centro organizador de microtúbulos
MTs	Microtúbulos
N	núcleo
NEDD1	<i>Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 1</i>
NEK2	<i>Kinasa-2 relacionada con NIMA (never in mitosis A)</i>
Nlp	<i>Ninein-like protein</i>
NME7	<i>Nucleoside diphosphate kinase 7</i>
NZ	Nocodazol
PACT	<i>Pericentrin AKAP450 centrosome targeting domain</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCM	Material pericentriolar
PCNT	Pericentrina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Yoduro de propidio
PLK1	<i>Polo-like kinase 1</i>
PLK4	<i>Polo-like kinase 4</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
Ran	<i>RAs-related Nuclear protein</i>
RE	Retículo endoplasmático

RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
RV	<i>reverse</i>
SAS4	<i>Spindle assembly abnormal protein 4</i>
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SMC	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
siRNA	<i>Short interference RNA</i>
Spc110	<i>Spindle pole body component 110</i>
STIL	<i>SCL-interrupting locus protein</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TGN	trans-Golgi network
TPX2	<i>Targeting protein for Xklp2</i>
WB	Western-Blot
WT	Silvestre
XMAP215	<i>Microtubule-associated protein 215 kDa</i>

RESUMEN



La organización del citoesqueleto de microtúbulos (MTs) así como el control del número absoluto de éstos es esencial en la regulación de diferentes procesos celulares tales como la división celular, el transporte direccional de proteínas o el establecimiento de la polaridad celular. La distribución de esta red no se establece de forma aleatoria, sino que depende de la localización y activación de los sitios intracelulares desde donde los MTs son nucleados. Esta nucleación tiene lugar en estructuras morfológicas definidas que se denominan centros organizadores de microtúbulos (MTOCs) (Lüders and Stearns 2007). En células animales en división, el centrosoma actúa como el principal MTOC celular (Bornens 2002), sin embargo, el Aparato de Golgi (AG) también presenta capacidad para nuclear MTs en células en interfase (Efimov et al. 2007). La actividad de estos dos sitios de nucleación de MTs varía a lo largo del ciclo celular sugiriendo la existencia de algún tipo de regulación coordinada de sus respectivas actividades. AKAP450, CDK5Rap2 y pericentrina (PCNT) son tres de las principales proteínas descritas como posibles reguladoras de dicho mecanismo de nucleación y presentes en ambos orgánulos. Así, en esta tesis, hemos llevado a cabo un análisis de los mecanismos implicados en el control del comportamiento coordinado de los diferentes MTOCs celulares combinando la eliminación de estos tres principales factores reclutadores de complejos γ TuRC (AKAP450, CDK5Rap2 y PCNT) y el uso del recientemente descubierto inhibidor de PLK4 (proteína esencial en la duplicación del centrosoma) centrinona.

Los resultados presentados demuestran que **las proteínas implicadas tradicionalmente en el reclutamiento de complejos γ TuRC no son esenciales para la nucleación de MTs desde el centrosoma en interfase; mientras que sí van a controlar esta función en el AG**. Varias líneas argumentales apoyan esta conclusión. Primera, la inhibición de la expresión de AKAP450, CDK5Rap2 y PCNT en células hTERT-RPE1 no afecta a los niveles de nucleación desde el centrosoma ni al reclutamiento de γ -tubulina. Centrosomas carentes de las tres proteínas son capaces de nuclear MTs a ratios normales gracias a la función de CEP192; quién sí parece ejercer una contribución importante pero no esencial en este mecanismo. Segunda, células carentes de estas cuatro proteínas aún presentaban cierta capacidad de nucleación de MTs desde el centrosoma, lo que demuestra la existencia de mecanismos adicionales a los generalmente considerados como canónicos. Tercero, en el caso del AG, es ya conocido que su capacidad para nuclear MTs depende de la presencia de AKAP450 (Rivero et al. 2009), y nuestros resultados demuestran que tanto CDK5Rap2 como pericentrina también influyen en estos niveles. Así, células carentes de CDK5Rap2 presentaban una menor capacidad de nucleación desde el AG mientras que en el caso de la ausencia de pericentrina, esta actividad se veía claramente potenciada; lo que indica el papel inhibitorio de la proteína. Ensayos de coimmunoprecipitación revelaron la existencia de dos tipos de complejos capaces de reclutar γ TuRCs; aquellos basados en AKAP450 y los basados en pericentrina. Ambos desempeñan funciones antagónicas en los mecanismos de nucleación desde el AG y son totalmente dispensables en el papel del centrosoma como MTOC.

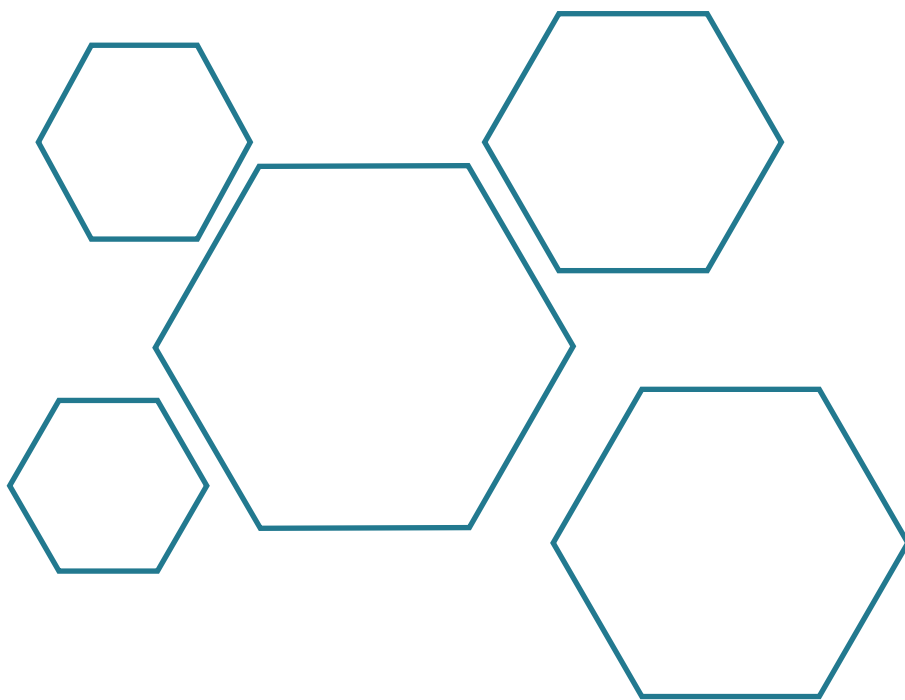
Es conocido que en procesos de diferenciación celular los diferentes MTOCs experimentan mecanismos de desregulación, permitiendo potenciar o limitar su actividad de manera controlada. Nuestros resultados apoyan la idea de que **la nucleación de MTs es un proceso con una jerarquía intrínseca en la que el centrosoma ocupa un lugar principal**. Ensayos con la droga centrinona

demonstraron que la ausencia de centrosoma provoca una estimulación significativa de la nucleación de MTs desde el AG; mientras que la presencia de centrosomas extras inhibe dicho mecanismo. Así, la pérdida o ganancia de centrosomas tiene un impacto en el comportamiento como MTOC del AG; situación que no ocurre de forma inversa como por ejemplo cuando se inhibe la nucleación de MTs desde el AG mediante la eliminación de AKAP450. Dado que la ausencia de PCNT estimula la capacidad de nucleación del AG de forma similar a cómo lo hace la ausencia del centrosoma, aunque en menor grado; nuestros datos parecen indicar que el efecto regulatorio del centrosoma sobre la función del AG podría estar mediado por el reclutamiento de la propia pericentrina a esta localización. En este sentido, nuestros experimentos también revelaron cómo los MTs son nucleados en células con sus dos principales MTOCs inactivos. Así, en estas condiciones, observamos la formación de **estructuras acentriolares bien definidas capaces de nuclear MTs desde localizaciones discretas no asociadas ni al AG ni al centrosoma**. El análisis en profundidad de dichas estructuras reveló que estos MTOCs acentriolares no se originan por un simple incremento de los niveles citoplásmicos o la localización ectópica de las proteínas centrosómicas; sino que presentan un claro ensamblaje regulado siendo **la pericentrina un componente esencial y necesario para su conformación**. En todos los casos, el proceso de nucleación siempre era dependiente de γ -tubulina.

Finalmente, los estudios con centrinona mostraron que **bajo cualquier condición experimental que implicara la ausencia de centrosomas, la densidad de MTs celular se duplicaba en comparación a las condiciones controles**. Incremento que se observa independiente del sitio desde donde los MTs son nucleados; ya sea el AG (células controles tratadas con centrinona) o los MTOCs citoplásmicos (células akap450 knock-out sin centrosoma). Estos datos indican que el centrosoma parece controlar el número absoluto de MTs existente en la célula, así como la distribución espacial de éstos, no sólo por medio de un proceso de nucleación activa, sino en parte también al actuar a modo de regulador negativo de la actividad de los demás MTOCs alternativos. Sorprendentemente, este incremento de la densidad de MTs generada por la ausencia de centrosomas no se repite en células carentes de pericentrina, sugiriendo que ésta constituye un factor clave en la conexión y regulación del efecto que la pérdida del centrosoma tiene en la capacidad de nucleación de MTs desde el AG.

Así, en este trabajo revelamos la existencia de un mecanismo mediante el cual el centrosoma es capaz de controlar el número y la distribución espacial de los MTs de células en interfase. Regulación que lleva a cabo no sólo controlando su propia actividad, sino también la de otros MTOCs alternativos; especialmente el AG. Por su parte nuestros resultados parecen también indicar que la pericentrina desempeña un papel esencial en esta regulación, actuando a modo de coordinador global del conjunto del proceso de nucleación de MTs.

INTRODUCCIÓN



I. EL CITOESQUELETO MICROTUBULAR

Los microtúbulos (MTs) son filamentos proteicos cilíndricos y huecos que se encuentran distribuidos por el citoplasma de todas las células eucariotas donde constituyen el citoesqueleto de MTs. Los MTs desempeñan numerosas funciones que son claves para la fisiología celular. Durante la división, los MTs constituyen la estructura del huso mitótico que es esencial para la correcta segregación de los cromosomas y demás elementos a las nuevas células hijas. Asimismo, los MTs permiten la movilidad celular al constituir, junto con otras proteínas accesorias, el axonema del cilio y el flagelo. Del mismo modo, sirven de vías para el transporte dirigido de orgánulos y vesículas por medio de proteínas motoras, así como de elementos necesarios en la transducción de señales (Desai and Mitchison 1997; Nogales 2001; Subramanian and Kapoor 2012).

Muchas de estas funciones dependen de la habilidad del citoesqueleto de MTs para organizarse en diferentes patrones que contribuyen tanto a la morfología como a la fisiología de cada tipo celular. Tal plasticidad requiere de un preciso control espaciotemporal del proceso de generación de MTs y de la dinámica de éstos una vez formados.

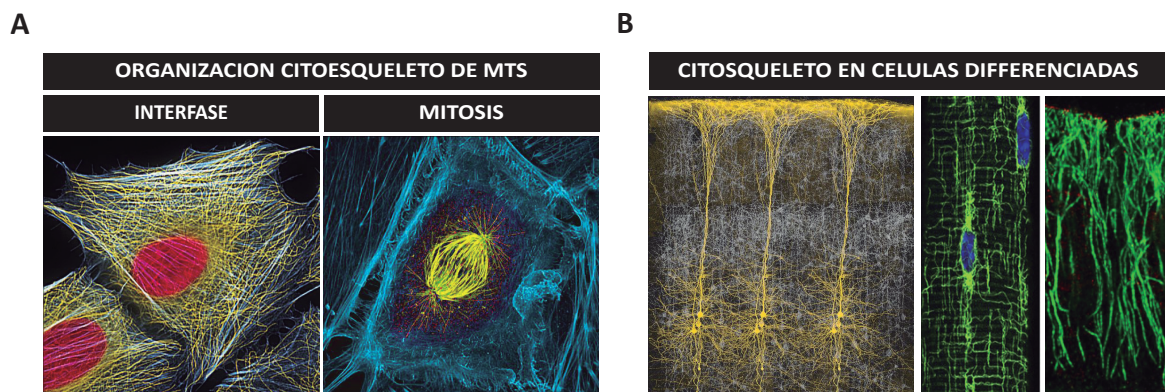


Figura 11. Organización del citoesqueleto de MTs en diferentes fases del ciclo y tipos celulares. (A) Imágenes de microscopía confocal de células en interfase (izquierda) y en metafase (derecha). Los microtúbulos se muestran en color amarillo y el citoesqueleto de actina en azul. **(B)** Imágenes de las diferentes organizaciones del citoesqueleto de MTs en células diferenciadas: neuronas neocorticales (izquierda), fibras de músculo esquelético (centro) y células de epitelio de colon (derecha). Tomadas de Dr Torsten Wittmann/Science Photo Library, Dra. Patricia Wadsworth, IBM/EPL Blue Brain Project, Oddoux et al JCB (2013) y Toya et al. PNAS (2015).

1.1. Estructura y dinámica de los MTs.

Los MTs son filamentos tubulares de aproximadamente 250 Å de diámetro formados por heterodímeros de α - y β -tubulina (Figura 12A) mediante un procedimiento dependiente de GTP. Las subunidades de tubulina establecen dos tipos de contactos entre filamentos: uno longitudinal a lo largo del MT generando los denominados protofilamentos y otro lateral entre protofilamentos (generalmente α -tubulina con α -tubulina y β -tubulina con β -tubulina) lo que da lugar a la circunferencia del MT (Alushin et al. 2014; Nogales, Wolf, and Downing 1998) (Figura 12A y 12B). La geometría del MT, sin embargo, no es del todo fija. Los contactos laterales, más flexibles y estables, pueden acoger

entre 11 y 16 protofilamentos *in vitro* (Chrétien and Wade 1991), aunque *in vivo*, casi todos los MTs presentan 13 protofilamentos, lo que sugiere la existencia de algún tipo de control a nivel celular que favorece tal distribución. La orientación que presentan las moléculas de α - y β -tubulina proporciona al MT una polaridad intrínseca de forma que la α -tubulina queda en el extremo (-) o de crecimiento lento del MT y la β -tubulina se encuentra en el extremo (+) o de crecimiento rápido (Alushin et al. 2014; Mitchison 1993; Mourey et al. 2011) (Figura 12B). Tanto el ensamblaje de los MTs, o polimerización, como el desensamblaje, o despolimerización, van acompañados de la unión, hidrólisis e intercambio de un nucleótido de guanina en el monómero de β -tubulina (la molécula de GTP unida a α -tubulina no es intercambiable y nunca se hidroliza). La hidrólisis de esta molécula de GTP no es necesaria en sí misma para el ensamblaje del MT pero si resulta fundamental para la transición de la fase de catástrofe (despolimerización) a rescate (repolimerización) y viceversa (Akhmanova and Steinmetz 2008) (Figura 12C).

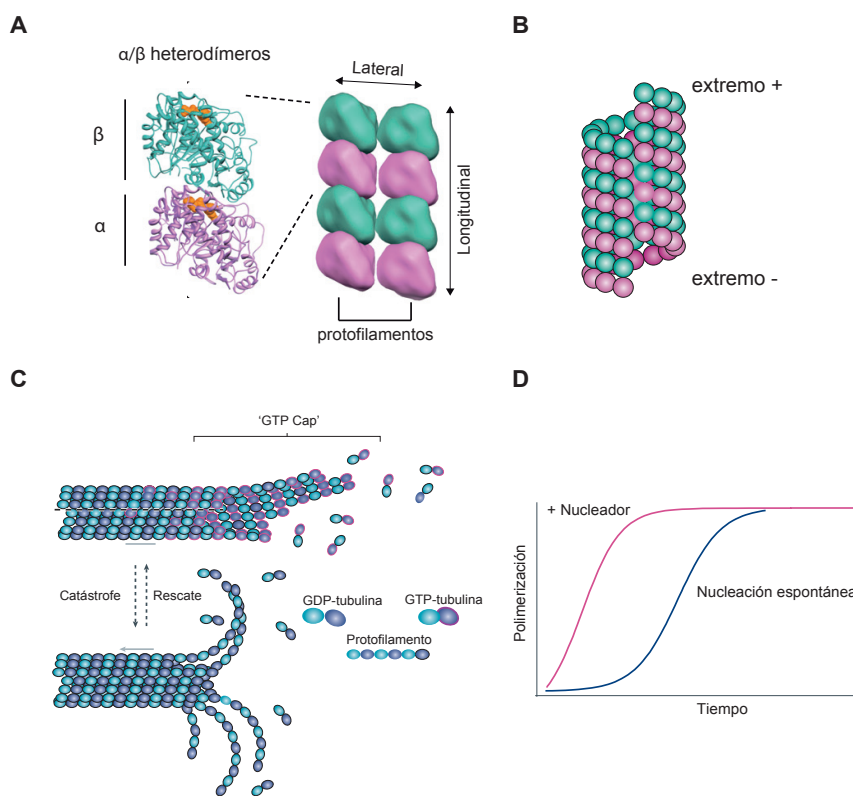


Figura 12. Estructura y formación de los MTs. (A) Los MTs están formados por heterodímeros de α/β -tubulina que generan filamentos lineales denominados protofilamentos mediante el establecimiento de interacciones laterales y longitudinales. (B) Los MTs consisten en estructuras helicoidales y cilíndricas en las que la orientación de las subunidades de α - y β -tubulina les confieren una polaridad intrínseca. Así, podemos distinguir un extremo (+) o de crecimiento rápido y un extremo (-) o de crecimiento lento. (C) Tanto el ensamblaje de MTs o polimerización como el desensamblaje o despolimerización están dirigidos por la unión, hidrólisis e intercambio de un nucleótido de guanina en el monómero de β -tubulina. (D) Gráfica que representa

el proceso de polimerización con respecto al tiempo en presencia o ausencia de factores nucleadores. Modificado de (Mourey et al. 2011; Roostalu and Surrey 2017)

La formación de nuevos MTs ocurre de manera espontánea *in vitro* cuando la concentración de dímeros de α/β -tubulina supera una concentración crítica (aproximadamente 20 μM) (Roostalu and Surrey 2017). Sin embargo, en las células, la concentración de dímeros de α/β -tubulina es menor, por lo que el proceso es cinéticamente desfavorable y requiere de la existencia de complejos específicos que sirvan de base para superar las limitaciones energéticas del proceso (Sulimenko et al. 2017) (Figura

I2D). Estos factores de nucleación necesarios para el inicio de la polimerización están constituidos por complejos multiproteicos que se activan tras su reclutamiento a estructuras morfológicas concretas que se denominan colectivamente Centros Organizadores de Microtúbulos o MTOCs (del inglés, *Microtubule-Organizing Centers*) (Mourey et al. 2011). Este requerimiento permite un claro control espaciotemporal del ensamblaje de MTs *in vivo* y, en consecuencia, de la estructura global de la red de MTs.

Los principales componentes de los complejos proteicos con capacidad de iniciar la polimerización son la γ -tubulina (miembro de la familia de las tubulinas) y las proteínas de complejo de γ -tubulina (GCPs de sus siglas en inglés *γ -tubulin complex proteins*) o las proteínas del anillo de γ -tubulina (GRIPs de las siglas en inglés *γ -tubulin ring proteins*) constituyendo los complejos pequeños de γ -tubulina (γ TuSC) o los complejos de anillo de γ -tubulina (γ TuRC), respectivamente.

Los MTs son estructuras muy dinámicas que continuamente crecen y se acortan por medio de un mecanismo denominado ‘inestabilidad dinámica’ (Ohi and Zanic 2016). Este comportamiento dinámico de los MTs se encuentra regulado tanto por factores intrínsecos (polaridad propia del heterodímero) como extrínsecos (proteínas capaces de interactuar con el MT). Las proteínas de interacción con los MTs más destacadas son las proteínas de unión a extremos (+) (+TIPs, *microtubule plus end tracking proteins*) o las denominadas proteínas asociadas a MTs (MAPs, *microtubule-associated proteins*), que interactúan a lo largo de toda la longitud de éste (Hohmann and Dehghani 2019) (Figura I3A). Este conjunto de proteínas pueden presentar efectos estabilizadores o desestabilizadores; cambiando la dinámica de polimerización del MT e incluso provocando el acortamiento del mismo (Hohmann and Dehghani 2019). Algunas de las proteínas más importantes pertenecientes a esta familia de proteínas +TIPs son las denominadas CLASPs (cytoplasmic linker associated protein) y APC (adenomatous polyposis coli) (Kita et al. 2006; Nakamura, Zhou, and Lu 2001) las cuales impiden los eventos de catástrofe del propio MT y promueven el rescate tras el proceso de acortamiento (Akhmanova and Steinmetz 2015). Gran parte de los efectos estabilizadores de las proteínas CLASPs se centran en la capacidad de éstas para establecer conexiones entre los propios MTs y el córtex celular. Otra familia importante de +TIPs son las denominadas proteínas EBs (*end-binding proteins*) quienes juegan un papel clave en regular el reclutamiento y la formación de complejos por parte de otras +TIPs, favoreciendo el crecimiento continuo del MT (Komarova et al. 2009) (Figura I3B). Las proteínas EBs, por tanto, se asocian con un incremento en los ratios de polimerización y una reducción del número de eventos de ‘catástrofe’ (Dong et al. 2015; Maurer et al. 2014). Curiosamente algunos miembros de esta familia tales como la espastina (K. J. Evans et al. 2005) o la katanina (Sharp and Ross 2012) ejercen el efecto contrario facilitando la rotura de los MTs.

Existen otras proteínas de interacción con MTs con función más estructural como las MAPs neuronales: las proteínas Tau o MAP2, que interactúan con el filamento de tubulina a lo largo de toda su longitud estabilizándolo y reduciendo la tasa de contracción del mismo (Dehmelt and Halpain 2005; Moores et al. 2006). Desempeñando así funciones antagónicas al de otras MAPs no estructurales ya mencionadas.

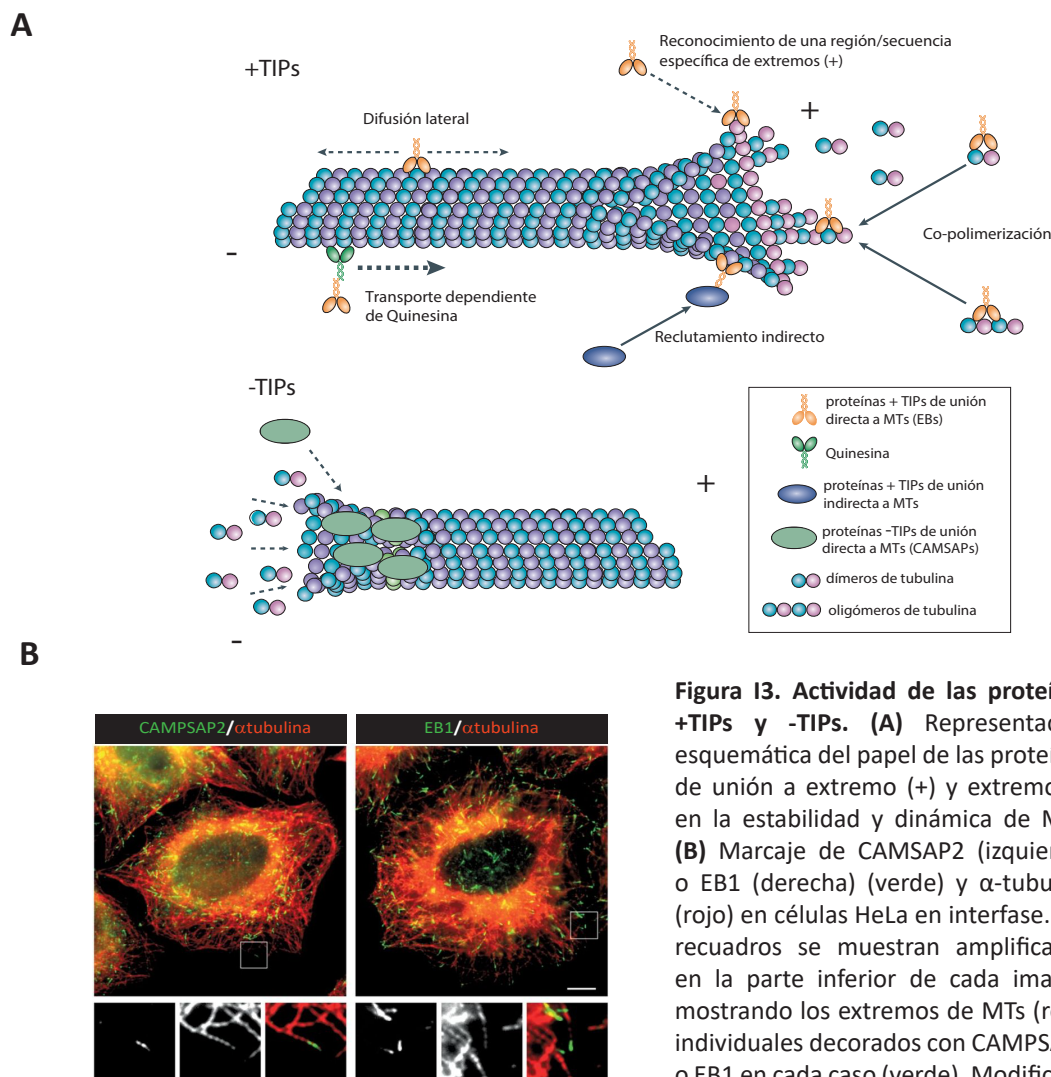


Figura 13. Actividad de las proteínas +TIPs y -TIPs. (A) Representación esquemática del papel de las proteínas de unión a extremo (+) y extremo (-) en la estabilidad y dinámica de MTs. (B) Marcaje de CAMSAP2 (izquierda) o EB1 (derecha) (verde) y α -tubulina (rojo) en células HeLa en interfase. Los recuadros se muestran ampliificados en la parte inferior de cada imagen mostrando los extremos de MTs (rojo) individuales decorados con CAMSAP2 o EB1 en cada caso (verde). Modificada de (Akhmanova and Steinmetz 2008)

Al igual que ocurre en el caso de los extremos (+), existe un conjunto de proteínas con capacidad para interactuar con los extremos (-) de los MTs afectando a la estabilidad de éstos. Junto a los γ TuRCs anteriormente descritos, este grupo de proteínas conocidas como -TIPs (*microtubule minus end tracking proteins*) incluye a las proteínas CAMSAPs (*calmodulin-regulated spectrin-associated proteins*) en mamíferos y la Patronina en invertebrados (Akhmanova and Steinmetz 2019) (Figura 13B). Todas poseen un dominio C-terminal específico denominado CKK (Hendershott and Vale 2014) donde reside su capacidad para reconocer los extremos (-) de los MTs. Dependiendo de la isoforma, las proteínas CAMSAPs pueden regular el crecimiento de los extremos menos (CAMSAP1), unirse a dicho extremo para inhibir su crecimiento (Patronina) o bien interactuar específicamente con haces de MTs preformados (CAMSAP2 y CAMSAP3), favoreciendo así la formación de haces estables de MTs pero sin directamente bloquear la polimerización desde los extremos (-) (Hendershott and Vale 2014; Jiang et al. 2018). Así, por ejemplo, en gusanos y mamíferos, la actividad de las proteínas CAMSAPs es especialmente relevante en células diferenciadas en interfase (Chuang et al. 2014) para la formación y

estabilización de patrones de MTs no centrosómicos, mientras que en *Drosophila*, la Patronina regula la estabilidad de los extremos (-) tanto en interfase como en mitosis (Derivery et al. 2015).

Hay que mencionar también las proteínas motoras quinesina y dineína, que aunque esenciales en el mecanismo de transporte de moléculas a lo largo de la red de MTs también pueden regular la dinámica y la organización de los mismos. Por lo general, las quinesinas se desplazan hacia los extremos (+), mientras que las dineínas se mueven hacia los extremos (-) de los MTs (Cianfrocco et al. 2015; Verhey, Kaul, and Soppina 2011), permitiendo el transporte dirigido de una gran variedad de elementos incluyendo componentes de membrana, moléculas implicadas en señalización o elementos de estabilización.

Por último, otro factor importante en lo que respecta a la regulación de la dinámica de MTs son las distintas modificaciones post-traduccionales que éstos experimentan y que alteran las propiedades del propio MT así como la afinidad de las diferentes MAPs hacia ellos (Song and Brady 2015). Algunas de las modificaciones más relevantes son la tirosinación, glutamilación y acetilación. La acetilación, por ejemplo, que consiste en la modificación del residuo lisina 40 de la molécula de α -tubulina, protege a los MTs frente al estrés mecánico gracias a un incremento en la flexibilidad del mismo, pero no supone una protección frente a los eventos de despolimerización (Portran et al. 2017). Así, a diferencia de otras modificaciones, esta acetilación no influye en la estabilidad de los MTs a través de proteínas MAPs, sino que parece afectar directamente a los contactos laterales dentro del protofilamento (Eshun-Wilson et al. 2019). La tirosinación, en cambio, afecta al reclutamiento de cierto tipo de proteínas de interacción con MTs tales como CLIP-170 o quinesina-1 (Konishi and Setou 2009; Roll-Mecak 2015). Así, las modificaciones post-traduccionales en términos generales constituyen factores claves en la regulación de la dinámica de MTs y en consecuencia del comportamiento del conjunto del citoesqueleto.

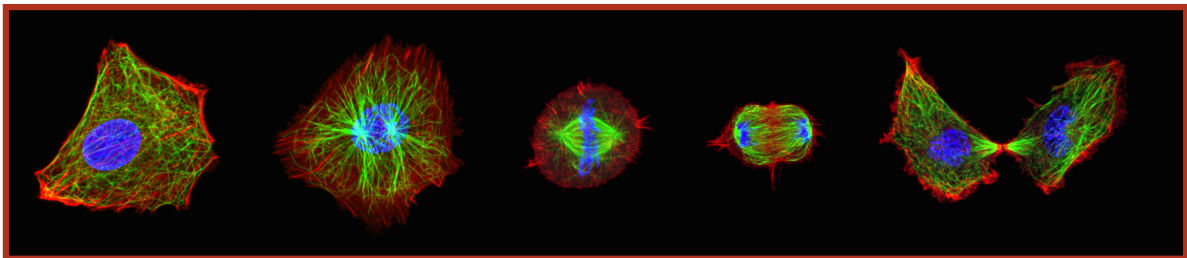


Figura 14. Citoesqueleto de MTs a lo largo del ciclo celular. Imágenes de microscopía confocal de células RPE1 en la que se muestra la distribución y organización del citoesqueleto de MTs a lo largo del ciclo celular. Los MTs aparecen en verde, el citoesqueleto de actina en rojo y el ADN marcado en azul. En interfase, los MTs (en verde) van a formar una red que se extiende a lo largo de toda la superficie de la célula, generando una estructura radial desde el centro a la periferia de ésta. Durante mitosis, los MTs van a ser mayoritariamente nucleados desde los polos, desde donde se dirigirán a los cromosomas (MTs cinetocóricos), al córtex de la célula (MTs astrales) o al polo opuesto (MTs polares), generándose el huso mitótico. Tomada de www.mitocheck.org

Tanto la dinámica como la organización de la red de microtúbulos de la célula sufren cambios profundos a lo largo del ciclo celular. En términos generales, durante interfase, la red de MTs está formada típicamente por polímeros de mayor longitud y relativamente estables, mientras que en mitosis, los MTs se acortan y adquieren una mayor dinámica (Keith, Feramisco, and Shelanski 1981;

Kreis 1987; Olmsted and Borisy 1973) (Figura 4). De este modo, la nucleación de MTs debe ser altamente regulada en el espacio y en el tiempo para asegurar una correcta formación de dicha red en cada situación. Cómo la célula activa el reclutamiento de γ -tubulina a los diferentes MTOCs y cómo éstos interactúan entre ellos son algunas de las cuestiones más interesantes en el campo.

II. CENTROS ORGANIZADORES DE MICROTÚBULOS (MTOCs)

La organización del citoesqueleto de MTs varía dependiendo del tipo celular, del momento del ciclo en el que éstas se encuentren, así como del grado de diferenciación de las mismas. Los mecanismos responsables de esta organización recaen directamente en la localización y actividad de los complejos de proteínas capaces de nuclear y estabilizar MTs. En las células humanas, las estructuras celulares que presentan esta capacidad se denominan MTOCs siendo los más destacados el centrosoma, el AG, la envuelta nuclear, el córtex celular o la mitocondria entre otros (Paz and Lüders 2018; Wu and Akhmanova 2017).

2.1. El Centrosoma

El centrosoma está considerado como el principal MTOC en células de mamífero que proliferan (M. Bornens 2012). Está constituido por un par de centriolos orientados perpendicularmente y rodeados por un material de naturaleza proteica denominado material pericentriolar (PCM), el cual es el responsable de la nucleación de MTs, así como de la estabilización y el anclaje de sus extremos menos (Figura I5A). Ambos centriolos presentan una estructura cilíndrica simétrica constituida por nueve tripletes de MTs (Kitagawa et al. 2011) (Figura I5). En las células de vertebrados, debido a los diferentes mecanismos de generación y maduración del centrosoma, los dos centriolos no son equivalentes ni morfológica ni funcionalmente. En células en G0 (quiescentes) o en células que proliferan durante la fase G1, el centrosoma contiene un centriolo maduro, el centriolo madre y un centriolo inmaduro que ha sido ensamblado durante el ciclo celular anterior, el centriolo hijo.

2.1.1. Estructura del centriolo

En células humanas, un centriolo maduro consiste en una estructura cilíndrica compuesta por nueve tripletes de MTs de aproximadamente 450 nm de altura y diámetros interno y externo de 130 y 250 nm respectivamente (Gönczy 2012). En la mayoría de los casos, incluyendo las células humanas, cada triplete, empezando en la parte proximal y desde el interior del mismo, contiene un microtúbulo A, un microtúbulo B y un microtúbulo C; siendo el microtúbulo A el único que presenta los 13 protofilamentos completos de α - y β -tubulina (Figura I6A). Los túbulos B y C están constituidos por 10 protofilamentos cada uno, compartiendo 3 protofilamentos con el túbulo anterior para de esta forma poder organizar MTs completos de 13 protofilamentos (Figura I6A). El túbulo A de cada triplete está conectado con el túbulo C del siguiente triplete colocado en el sentido de las agujas del reloj. En la región distal, por su parte, la estructura está constituida por nueve dobletes de microtúbulos en lugar

de tripletes, estableciéndose conexiones entre el túbulo A de un doblete y el B del siguiente (Paintrand et al. 1992; Uzbekov and Prigent 2007). Así, el centriolo, es una estructura con una polaridad intrínseca con los extremos (-) de los MTs orientados hacia el extremo proximal y el extremo (+) hacia la región más distal (Figura I6B).

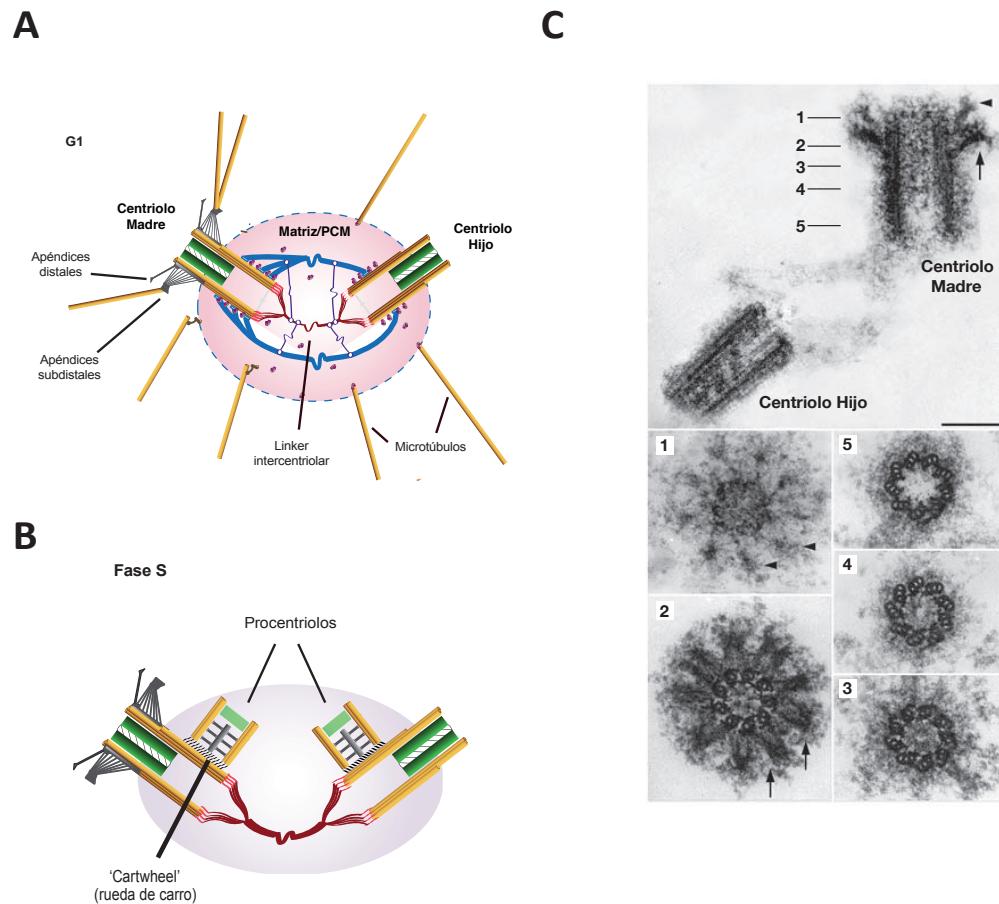


Figura I5. Esquema de la estructura del centrosoma humano en G1/S. (A) Representación esquemática de un centrosoma procedente de células humanas durante la fase G1 del ciclo celular. Los centriolos presentan unas dimensiones de 450 nm de largo y 250 nm de diámetro, aproximadamente. Se distingue un centriolo maduro o centriolo Madre y un centriolo inmaduro o Hijo. Ambos aparecen unidos entre sí por un “linker” o conector formado por diferentes proteínas. El PCM se representa a modo de matriz en torno a los centriolos desde donde se nuclean los MTs. **(B)** Representación esquemática de un par de centrosomas durante la fase S. Se observa como los procentriolos se empiezan a originar de manera ortogonal al centriolo ya existente y en una posición concreta de éste. **(C)** Ultraestructura (microscopía electrónica) de un centrosoma humano aislado de células KE37. Los cinco paneles numerados en la parte inferior corresponden a las secciones transversales a lo largo del centriolo madre en los puntos indicados en la imagen superior. Las puntas de flechas y las flechas indican los apéndices distales y subdistales respectivamente. Modificado de (Azimzadeh and Bornens 2007; Fu, Hagan, and Glover 2015; Gönczy 2012).

Los tripletes/dobletes de MTs que forman el andamiaje del centriolo presentan una organización única en referencia a cualquier otro MT de la célula y además se caracterizan por su alta estabilidad y resistencia. La propia organización de los MTs en tripletes y dobles, las modificaciones post-

traduccionales de las subunidades de α - y β -tubulina al igual que los múltiples elementos asociados a éstas, contribuyen notablemente a la estabilidad del centriolo (Kochanski and Borisy 1990).

En el lumen centriolar del andamiaje de MTs se pueden diferenciar una estructura denominada rueda de carro (*cartwheel* en inglés), una densidad luminal situada en la región distal y otros elementos adicionales (Figura I6). Mientras la rueda de carro está claramente implicada en el ensamblaje de nuevos centriolos así como en la formación de los cuerpos basales, la función de la densidad luminal (si es que posee alguna) es aún desconocida (Winey and O'Toole 2014). La rueda de carro, cómo su nombre indica, es una estructura que recuerda al eje central y los radios de una rueda (siendo la rueda el andamio de MTs visto desde arriba) (Michel Bornens and Gönczy 2014; Hirono 2014; Winey and O'Toole 2014) (Figura I6). Esta estructura define el extremo más proximal del centriolo, siendo la zona más cercana al otro centriolo. La rueda de carro está constituida por un anillo central (centro o núcleo) del que salen nueve filamentos. Cada uno de estos filamentos está conectado a un túbulo A del triplete de MTs por medio de una estructura denominada cabeza de alfiler o '*pinhead*' (Michel Bornens and Gönczy 2014; Hirono 2014; Winey and O'Toole 2014) (Figura I6A).

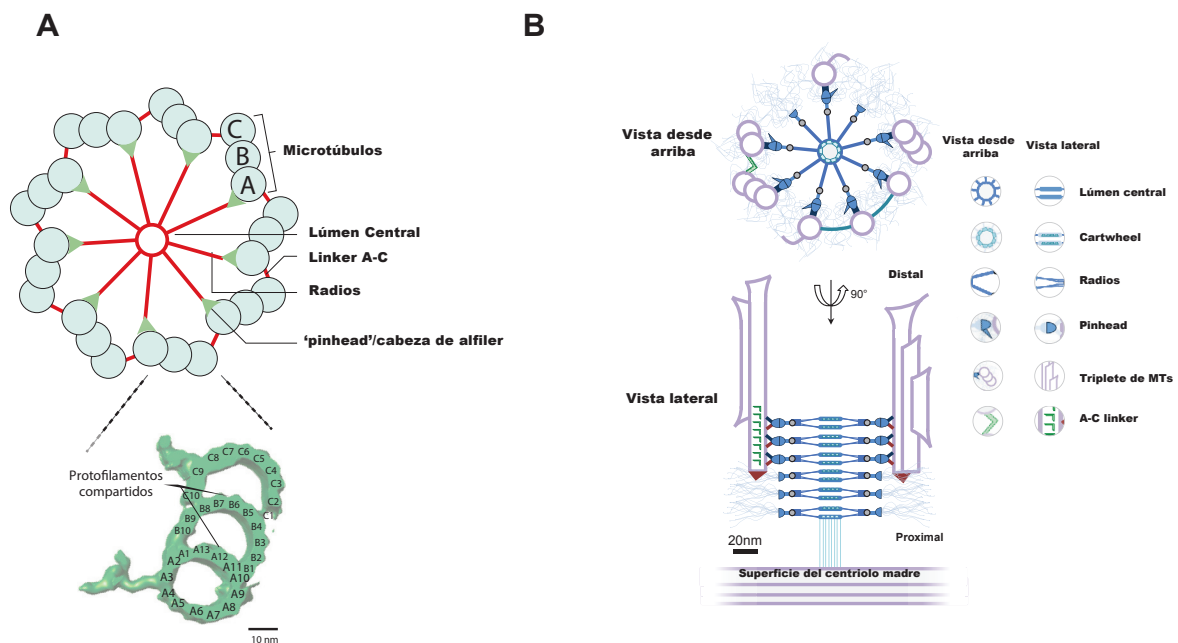


Figura I6. La rueda de carro o '*cartwheel*' representa el andamiaje que otorga la estructura y simetría al centriolo. **(A)** Representación esquemática de la rueda de carro del centriolo observada desde la región proximal de éste. La rueda de carro ('*cartwheel*') se caracteriza por un lumen central de 20-25 nm de diámetro a partir del cual parten 9 radios que conectan con los microtúbulos A por medio de la 'cabeza de alfiler'. Los tripletes de MTs están conectados entre sí por medio del linker A-C. En la parte inferior se muestra una imagen ampliada del triplete de MTs. Tres protofilamentos se comparten entre los microtúbulos A y B, así como entre el B y el C. **(B)** Diagrama esquemático de la formación del procentriolo entorno a la rueda de carro sobre la superficie del centriolo madre. Modificado de (Banterle and Onczy 2017; Gönczy 2012; Guichard, Hamel, and Gönczy 2018)

En la mayoría de los casos, múltiples ruedas de carro se encuentran apiladas en el lumen del centriolo, aunque el número de éstas varía dependiendo del organismo y del estado de maduración del centriolo (Figura I5B). La mayoría de organismos presentan varias ruedas de carro apiladas en los primeros 100 nm de la región más proximal del centriolo (Michel Bornens and Gönczy 2014; Hirono 2014) (en mamíferos esta estructura se pierde tras la mitosis) (Strnad et al. 2007).

Los dos centriolos que constituyen el centrosoma se encuentran unidos por su extremo más proximal (Figura I5A). La zona específica del centriolo madre desde donde se ensambla el nuevo centriolo en cada ciclo es el punto desde donde permanecen unidas ambas estructuras tras separarse. Sin embargo, tanto el punto de ensamblaje del nuevo centriolo como la estructura que los mantiene unidos posteriormente no presentan una morfología muy definida. La proteína C-Nap1 parece localizarse en dicha estructura (Michel Bornens et al. 1987; Winey and O'Toole 2014). C-Nap1 es un sustrato de la proteína quinasa Nek2 (Fry et al. 1998) y su fosforilación por parte de ésta última parece estar implicada en la disociación de C-Nap1 de los centriolos provocando la ruptura del haz fibroso que los mantiene unido (formado por C-Nap1 junto con Rootelin y LRRC45) (He et al. 2013; Mayor et al. 2002). El control y regulación de la cohesión entre centriolos resulta esencial para los procesos de duplicación de centriolos así como la formación del huso mitótico (Agircan, Schiebel, and Mardin 2014; Firat-Karalar and Stearns 2014).

El extremo distal del centriolo madre se caracteriza por otro lado por la presencia de los denominados apéndices distales y subdistales (Azimzadeh and Bornens 2007; Michel Bornens and Gönczy 2014; Graser et al. 2007; Ishikawa et al. 2005; Piel et al. 2000) (Figura I5A e I5C). Estas estructuras se añaden a centriolos ya existentes y que han superado un ciclo celular y, por tanto, constituyen marcadores de maduración. La incorporación de los apéndices distales hace posible que el centriolo se convierta en un cuerpo basal y pueda nuclear un cilio primario (Jana, Marteil, and Bettencourt-Dias 2014). En una localización más proximal a los apéndices distales se encuentran los apéndices subdistales (Figura I5), que a menudo aparecen a modo de estructuras triangulares unidas lateralmente a la estructura microtubular del centriolo y que están implicadas en el anclaje de éstos (Kodani et al. 2013). Finalmente, el extremo más proximal del centriolo está especializado en el reclutamiento de una matriz lasa de proteínas que constituyen el PCM y que son las principales responsables de la nucleación y organización de la red de MTs desde el centrosoma (Lüders and Stearns 2007) (Figura I5A).

2.1.2. Ciclo de duplicación del centriolo.

Los centriolos han de duplicarse una vez, y sólo una, en cada ciclo celular con el objeto de que tras la división cada célula hija herede dos, y solo dos, centriolos, un centriolo madre y un centriolo hijo. La duplicación de los centriolos es, por tanto, un proceso altamente regulado que asegura que un único centriolo se origina a partir de cada centriolo pre-existente (Arquint and Nigg 2016).

El mecanismo de duplicación de los centriolos comienza en la transición G1-S, cuando una nueva estructura que se denomina procentriolo comienza a crecer ortogonalmente desde el extremo más proximal de cada uno de los dos centriolos ya existentes (Figura I5B e I7). Una vez originados, los

procentriolos se elongan a lo largo de las fases S y G2 y, al final de mitosis, el huso mitótico segrega el par de centriolos duplicados y cada célula hija resultante contiene dos centriolos completos (Firat-Karalar and Stearns 2014) (Figura I7). Por convención, se denomina procentriolo al nuevo centriolo mientras permanece unido al centriolo madre, y una vez separado de éste, pasa a llamarse centriolo hijo (Michel Bornens and Gönczy 2014) (Figura I7).

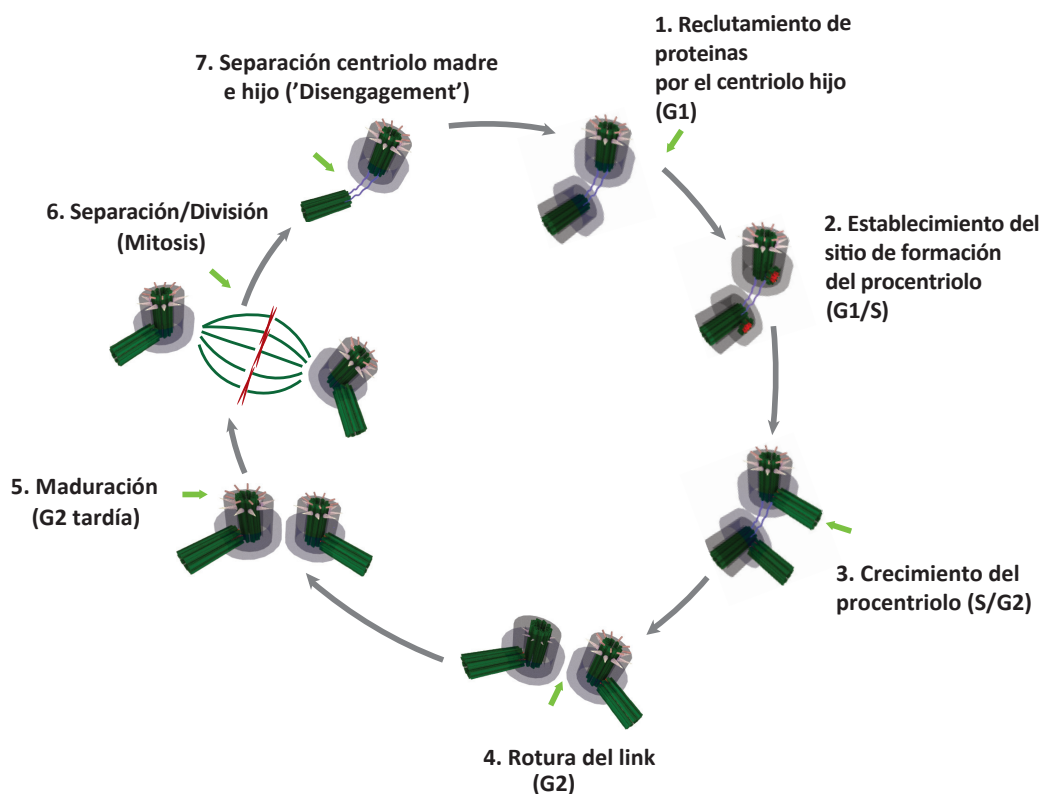
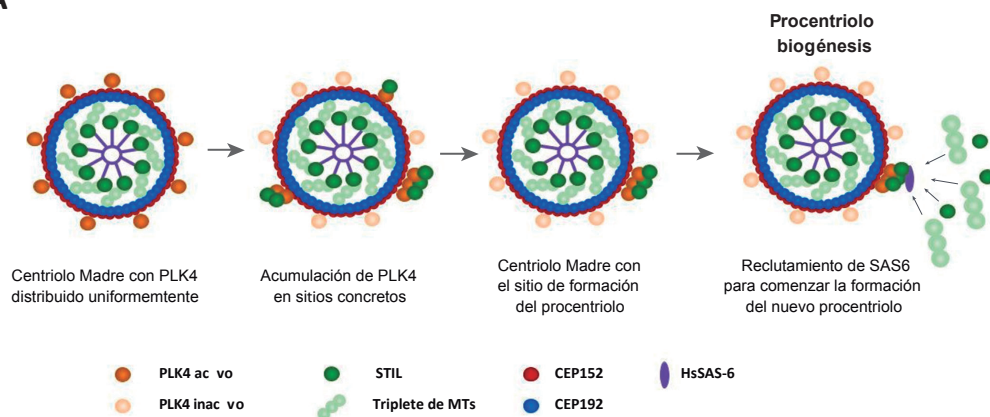


Figura I7. Ciclo de duplicación de los centriolos. Representación esquemática del ciclo de duplicación de los centriolos en células humanas en división. 1) A lo largo de G1 el centriolo hijo recluta CEP192 y CEP152. 2) Aproximadamente en la transición de G1 a S, un procentriolo emerge de cada uno de los dos centriolos existentes en un proceso dependiente de PLK4. 3) A lo largo de S/G2, el procentriolo crece. 4) En G2, el link que une a los centriolos originales (Madre e hijo) se degrada permitiendo la formación de dos centrosomas independientes, cada uno de ellos con un centriolo parental y un procentriolo. 5) Durante G2 tardía y en la entrada a mitosis, se produce la maduración, de forma que el PCM se incrementa y el centriolo hijo adquiere apéndices distales y subdistales. 6) Durante mitosis, los dos centrosomas (ahora polos mitóticos) contribuyen a la formación del huso bipolar. El paso por mitosis hace competentes para la duplicación en el siguiente ciclo a ambos centriolos hijos. 7) Al final de Mitosis, la modificación por PLK1 de los procentriolos los hace competentes para reclutar PCM al separarse del centriolo parental al que estaban unidos. Modificado de (Banterle and Onczy 2017)

La formación del procentriolo es un proceso estrictamente dependiente de los niveles y actividad de la proteína quinasa PLK4 (*Polo-like kinase 4*) cuya principal función consiste en determinar el origen del nuevo centriolo (T.-S. Kim et al. 2013) (Figura I8). En células de mamífero, PLK4 es reclutado a los centriolos mediante dos proteínas de andamiaje, CEP152 y CEP192, que forman anillos estructurales alrededor del centriolo madre a largo de los cuales se distribuye PLK4 durante G1 (Cizmecioglu et al. 2010; Hatch et al. 2010; T.-S. Kim et al. 2013; Park et al. 2014; K. F. Sonnen et al. 2013) (Figura I8). La

posterior unión con la proteína STIL estabiliza PLK4 en un punto concreto de ese anillo y permite que el resto de la proteína PLK4 existente desaparezca mediante un mecanismo autocatalítico de degradación, estableciendo así el punto exacto de formación del nuevo centriolo y garantizando que la duplicación se produce en un único punto específico (Arquint et al. 2015; Ohta et al. 2014). Tras esta unión a la proteína STIL, PLK4 experimenta un cambio conformacional generando una activación de sí misma mediante transfosforilación (Arquint et al. 2015; Lopes et al. 2015; Moyer et al. 2015). La proteína PLK4 fosforilada, es capaz a su vez de fosforilar a STIL que recluta a ese sitio preciso a la proteína HsSAS-6 que constituye el principal elemento estructural sobre el que se generará la nueva estructura de rueda de carro (Van Breugel et al. 2011; Kitagawa et al. 2011) que originará el procentriolo naciente (Dzhindzhev et al. 2017; Kratz et al. 2015; Moyer et al. 2015; Ohta et al. 2014) (Figura I8).

A



B

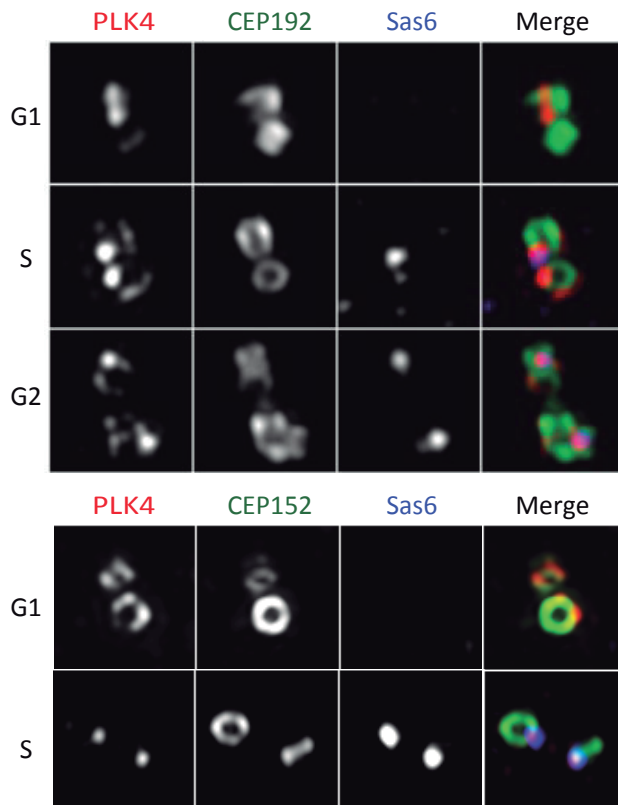


Figura I8. Modelo de la elección del sitio de formación del procentriolo.

(A) Representación esquemática del reclutamiento de PLK4 y HsSAS-6 para la formación del procentriolo. Tras la división celular los centriolos deben duplicarse para formar dos nuevos pares de centriolos. Complejos proteicos formados por PLK4 activa y STIL determinan el sitio de formación del nuevo procentriolo. HsSAS-6 es reclutado a dicha localización y se inicia la formación de la rueda de carro que originará el centriolo. **(B)** Células U2OS marcadas con anti-PLK4 (rojo), anti-Sas6 (azul) y anti-CEP192 o anti-CEP152 (verde) según se indica en cada caso. El triple marcaje se muestra a la derecha. Se observa el patrón de localización subcentrosomal y reclutamiento de las proteínas a lo largo del ciclo. Modificado de (Ignacio, Coffman, and Dawes 2019; T.-S. Kim et al. 2013).

Además del control de la concentración y reclutamiento de las proteínas iniciadoras en la formación del procentriolo, también existe un tipo de bloqueo intrínseco del centrosoma al proceso de reduplicación, garantizando que la duplicación ocurre una sola vez por ciclo celular. Así, el centrosoma, es capaz de detectar su estado de duplicación e impedir la reduplicación del mismo hasta que su paso por mitosis le confiera la capacidad para una nueva etapa de duplicación en el siguiente ciclo celular (Firat-Karalar and Stearns 2014). De este modo, la competencia para poder iniciar una nueva ronda de duplicación depende de dos procesos principales: la desconexión o '*disengagement*' de los centriolos, lo cual permite la reduplicación del centriolo madre (Figura I8) y la conversión centriolo-centrosoma necesaria para que el centriolo hijo adquiera capacidad de duplicación (Nigg and Holland 2018).

En los vertebrados, la desconexión de los centriolos que ocurre al final de mitosis, requiere de la actividad de la quinasa mitótica PLK1 y de la proteína separasa, que es la proteasa responsable de la separación de las cromátidas hermanas en la transición metafase a anafase (Tsou et al. 2009). PLK1 promueve la degradación dependiente de separasa de la estructura de unión existente entre el centriolo madre y el centriolo hijo a la salida de mitosis, y dicha modificación es esencial para hacerlos competentes para la duplicación en el siguiente ciclo celular (Firat-Karalar and Stearns 2014; Lončarek, Hergert, and Khodjakov 2010) (Figura I7).

2.1.2.1. Centrinona

En 2015, el grupo de K. Oegema y A. Desai describieron dos inhibidores específicos de la quinasa PLK4 denominados centrinona y centrinona B. Para ello, tomaron un inhibidor de las proteínas Aurora quinasa, el compuesto VX-680, que también inhibía de forma parcial a PLK4, y mediante ensayos de mutagénesis en diferentes residuos, generaron estos dos compuestos capaces de inhibir PLK4 de manera selectiva, mostrando *in vivo*, hasta mil veces más especificidad por esta quinasa que por Aurora A o Aurora B (Wong et al. 2015).

Dichos productos inhiben de manera reversible la actividad de PLK4 al impedir la transición a su estado activo, lo que previene la asociación de la quinasa con el centriolo y por tanto bloquea el mecanismo de duplicación del mismo (Wong et al. 2015). Esta inhibición, impide la formación de nuevos centriolos sin afectar a los centriolos ya existentes (Habedanck et al. 2005), lo que tras varios ciclos de división celular da lugar a la aparición de células sin centriolos y por ende sin centrosomas (Figura I9).

El uso de esta droga ha revelado aspectos importantes de la fisiología del centrosoma. Uno de ellos ha sido demostrar que la pérdida del centrosoma en células no tumorales provoca su parada en la fase G1 del ciclo celular por medio de un mecanismo específico dependiente de p53 (Meitinger et al. 2016; Wong et al. 2015), pero independiente de mecanismos de control tales como la respuesta a daño en el ADN, los errores en la segregación de cromosomas o la extensión de la duración normal de mitosis, que son los mecanismos tradicionales que activan la expresión de p53 e inducen la parada del ciclo celular. En un estudio posterior, Meitinger y colaboradores (Meitinger et al. 2016), identificaron que las proteínas 53BP1 (*p53-binding protein*) y USP28 (deubiquitinasa USP28) desempeñan un papel

esencial en el mecanismo que induce la activación de p53 y la consiguiente parada en G1 tras la pérdida del centrosoma. Sin embargo, aún no está totalmente claro cómo se genera dicha activación y si la pérdida del centrosoma provoca por sí misma este incremento en los niveles de p53 o dicho aumento es consecuencia de un efecto indirecto al alterar otras funciones celulares.

Estos resultados revelaron por tanto, que los centrosomas son esenciales para la proliferación normal de las células humanas, contrariamente a lo descrito previamente en *Drosophila* (Basto et al. 2006). Sin embargo, las células transformadas (líneas celulares cancerosas como HeLa) sí son capaces de dividirse indefinidamente en ausencia de centriolos, probablemente debido a que suelen presentar alteraciones en el supresor tumoral p53.

Otro de los resultados más característicos obtenidos en los estudios de centrinona en relación con el trabajo de esta tesis doctoral es que la inhibición de PLK4 previene la formación de nuevos centriolos pero sin afectar la estructura y organización básica de otros orgánulos esenciales en la conformación del citoesqueleto de MTs tales como el AG (Wong et al. 2015), demostrando de nuevo la autonomía de éste en cuanto a su capacidad para nuclear MTs y mantener una morfología adecuada. En este sentido, estudios recientes han demostrado que la eliminación del centrosoma provoca un aumento en la capacidad de nucleación de MTs del AG, observándose un claro marcaje de γ -tubulina sobre estas localizaciones, señal no apreciable en las células controles (Wu et al. 2016).

Así, el empleo de estas drogas está permitiendo caracterizar por primera vez de manera precisa el efecto que la ausencia del centrosoma tiene en la célula y la función de éste en diferentes sistemas celulares (Wong et al. 2015). Además, permite de manera precisa analizar el impacto que la ausencia de MTs nucleados desde el principal MTOC celular tiene en diferentes estadios y procesos fisiológicos.

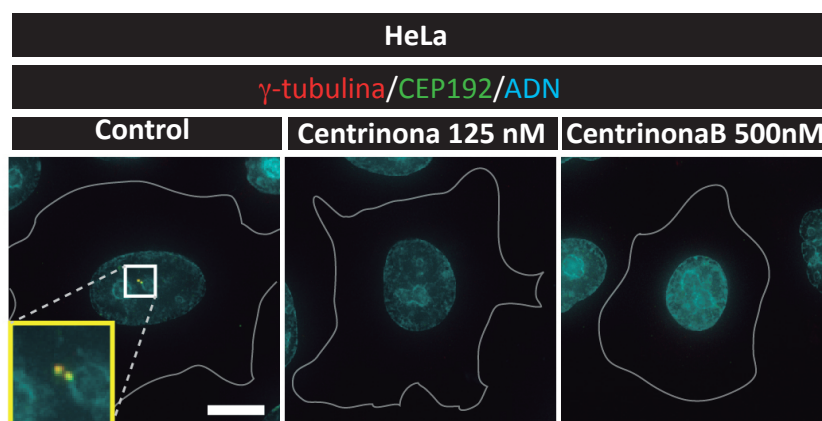


Figura 19. Centrinona y centrinona B inhiben la actividad de PLK4 impidiendo la duplicación de los centriolos y generando células sin centrosoma. Células HeLa tratadas durante 3 días con DMSO (control), centrinona 125 nM o centrinona B 500 nM (según se indica en cada caso). Se observa como el marcaje en inmunofluorescencia de γ -tubulina y CEP192

desaparece en las células tratadas con la droga, indicando la pérdida de centriolos. El recuadro amplificado en la primera imagen marca el centrosoma. Las líneas blancas representan el contorno de la célula. Barra de escala 10 μ M. Modificado de (Wong et al. 2015).

1.1.1. Estructura y dinámica del PCM

El centrosoma, como ya hemos descrito, es un orgánulo celular que no se halla rodeado por ninguna membrana y que está compuesto por dos estructuras microtubulares cilíndricas centrales

o centriolos, rodeados por una densa red de proteínas denominada material pericentriolar o PCM (Rale, Kadzik, and Petry 2018). Este PCM ha sido tradicionalmente descrito como un material amorfo y sin organización de acuerdo con las imágenes obtenidas por microscopía electrónica. Sin embargo, diferentes avances en microscopía de superresolución combinados con el uso de anticuerpos específicos frente a diferentes epítomos a lo largo de las proteínas presentes en dicha estructura (permitiendo determinar la orientación de las mismas) (Fu and Glover 2012; Lawo et al. 2012; Mennella et al. 2012; Katharina F. Sonnen et al. 2012), han servido para dilucidar esa masa amorfa, demostrando la existencia de una compleja estructura de proteínas capaz de experimentar profundos cambios en composición y organización durante la transición de interfase a mitosis. Así, los trabajos simultáneos llevados a cabo por los grupos de Glover, Nigg, Pelletier y Agard han descrito con bastante detalle no sólo la estructura del propio PCM (especialmente distribución de proteínas), sino también la arquitectura y organización del conjunto de éste. En interfase, los diferentes elementos del PCM se hallan distribuidos en capas concéntricas sustentadas por una estructura radial (Lawo et al. 2012; Mennella et al. 2012) (Figura I10). que contienen pericentrina (PCNT) (Lawo et al. 2012; Mennella et al. 2012), una proteína de gran tamaño y que adopta una estructura tipo *coiled-coil* con su extremo C-terminal anclado al interior del PCM, próximo a los centriolos (Lawo et al. 2012; Mennella et al. 2012) (donde se sitúa un dominio conocido como '*PACT domain*' (*pericentrin-AKAP450 centrosomal targeting domain*), que resulta esencial para su localización en ésta estructura (Gillingham and Munro 2000), y el extremo N-terminal proyectándose hacia el exterior (Figura I10 e I11).

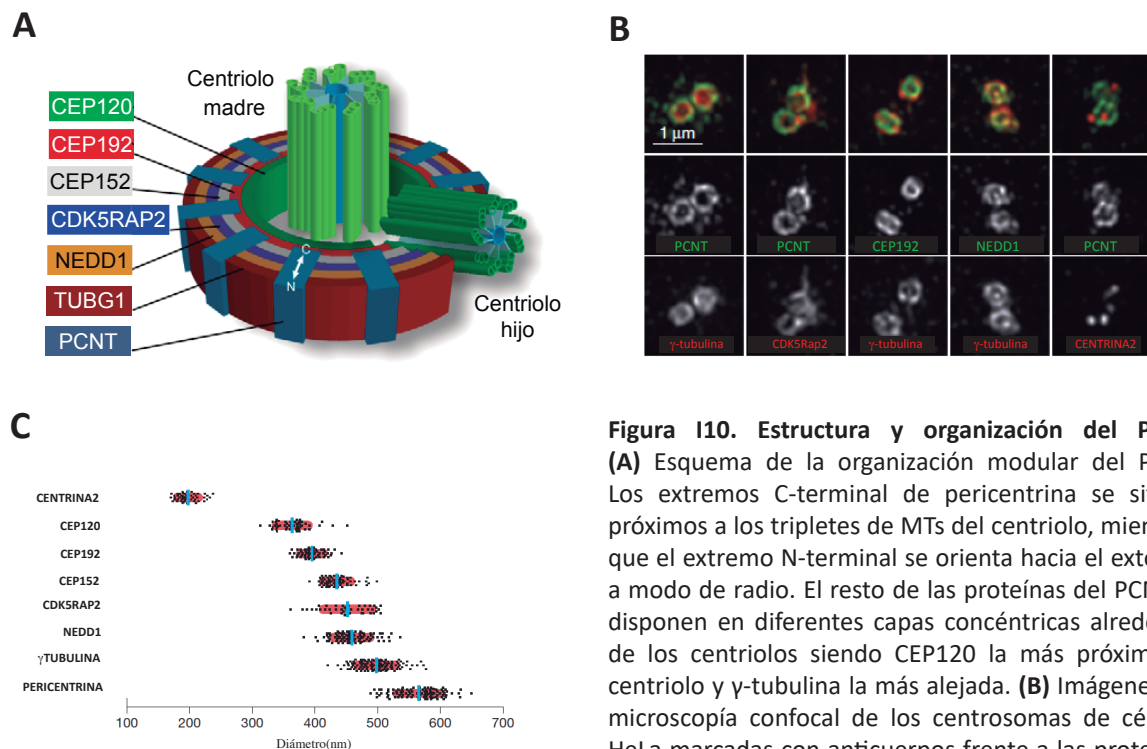


Figura I10. Estructura y organización del PCM.

(A) Esquema de la organización modular del PCM. Los extremos C-terminal de pericentrina se sitúan próximos a los tripletes de MTs del centriolo, mientras que el extremo N-terminal se orienta hacia el exterior a modo de radio. El resto de las proteínas del PCM se disponen en diferentes capas concéntricas alrededor de los centriolos siendo CEP120 la más próxima al centriolo y γ -tubulina la más alejada. **(B)** Imágenes de microscopía confocal de los centrosomas de células HeLa marcadas con anticuerpos frente a las proteínas del PCM/centriolo indicadas en cada caso (PCNT, γ -tubulina, CDK5Rap2, CEP192, NEDD1 y Centrina2). La fila superior muestra el doble marcaje de las proteínas indicadas en las filas inferiores. **(C)** Cuantificación del diámetro del anillo más externo (nm) formado por las proteínas indicadas en (B) además de CEP120 y CEP152. Modificado de (Lawo et al. 2012; Pearson 2014)

En este momento del ciclo celular, el PCM presenta un radio de aproximadamente 100 nm que es la longitud estimada de la PCNT por lo que ésta podría definir el límite externo del PCM en interfase (Lawo et al. 2012). No está claro aún si otras proteínas del tipo *coiled-coil* similares a la PCNT como AKAP450 también forman parte de tales estructuras radiales rodeando los centriolos (Gillingham and Munro 2000).

El resto de las proteínas del PCM que se han estudiado se disponen en diferentes capas concéntricas alrededor de los centriolos. Desde el interior al exterior, dichas capas contienen CEP120, CEP192, CEP152, CDK5Rap2, NEDD1 y γ -tubulina (Lawo et al. 2012) respectivamente (Figura I10). La capa más externa que contiene CDK5Rap2, NEDD1 y γ -tubulina podría proporcionar los sitios de anclaje y nucleación de MTs del centrosoma en interfase.

Al contrario de lo que ocurre con la duplicación del centriolo a lo largo del ciclo celular, el ensamblaje y distribución del PCM aún no se conoce en profundidad. El primer paso en este ensamblaje y formación del PCM tiene lugar en interfase e implica el reclutamiento de un conjunto de proteínas en torno a los centriolos que originarán las diferentes capas concéntricas que ya hemos mencionado (Rale, Kadzik, and Petry 2018) (Figuras I10 e I11). Se ha descrito que PCNT, CDK5Rap2 y CEP152 forman complejos citoplásmicos que vía la proteína CPAP interaccionan directamente con los centriolos, originando el PCM inicial (Conduit et al. 2010; Gopalakrishnan et al. 2011).

En una etapa posterior, durante la transición interfase a mitosis, el PCM incrementa su tamaño y capacidad para nuclear MTs en un proceso conocido como maduración del centrosoma (Palazzo et al. 2000; Rale, Kadzik, and Petry 2018) (Figura I11). Durante este proceso de maduración, que es dependiente de la quinasa mitótica PLK1, se acumulan distintos componentes tales como PCNT, CEP152, CEP192 y CDK5Rap2 entre otros (Dobbelaere et al. 2008; Gopalakrishnan et al. 2011), y especialmente γ TuRCs. Tales componentes no adoptan una estructura tan bien definida como en el caso del PCM interfásico y sólo es posible distinguir una nube de material proteico rodeando a los centrosomas recién duplicados.

En la maduración del PCM, la quinasa PLK1 inicia la expansión del material pericentriolar y su actividad es esencial para mantenerlo anclado a los centriolos (Mahen et al. 2011). Así, PLK1 fosforila a la proteína PCNT lo que promueve el reclutamiento de CEP192, NEDD1, γ -tubulina y, la quinasa mitótica Aurora A (K. Lee and Rhee 2011). A partir de este momento, el PCM comienza a expandirse a lo largo de los radios de PCNT acumulando diferentes capas de material pericentriolar. El mecanismo concreto por el que se desarrolla este proceso aún no se conoce con exactitud. (Figura I11).

Al igual que ocurre con otras estructuras celulares, el tamaño del PCM varía según el tipo celular. Se ha propuesto que la expansión del PCM y su tamaño máximo vienen determinados por mecanismos tanto dependientes como independientes del centriolo (S. Kim, Kim, and Rhee 2011). La unión del PCM a los centriolos parece ser un paso limitante en la velocidad de incorporación de los componentes de éste, lo que aseguraría su correcto y estricto ensamblaje alrededor de éstos (Conduit et al. 2010; Decker et al. 2011).

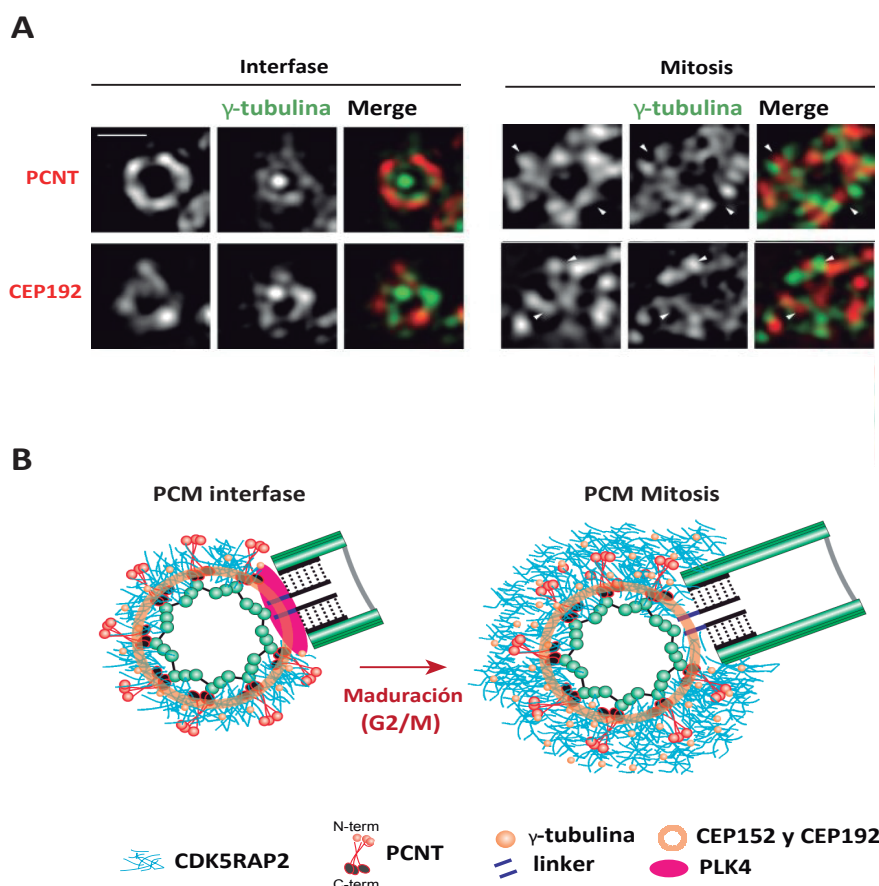


Figura I11. Modelo de organización del PCM durante la maduración del centrosoma. (A) Imágenes de microscopía 3D-SIM de centrosomas de células U2OS marcados con anticuerpos anti- γ -tubulina (verde) y anti-PCNT o CEP192 (rojo) según se indica en cada caso. Se muestran centrosomas de células en interfase (izquierda) y células en mitosis (derecha). La localización de γ -tubulina en interfase y mitosis se muestra relativa a PCNT y CEP192. Las puntas de flecha indican los sitios de no colocalización. **(B)** Representación esquemática de un centrosoma de mamíferos durante el proceso de maduración. La capa más externa del PCM experimenta una clara expansión como consecuencia de la incorporación de nuevo material pericentriolar y con ella expande su capacidad de nucleación de MTs. Modificado de (Pearson 2014).

2.2. Mecanismos de nucleación de MTs

La organización y nucleación de MTs debe estar regulada en espacio y tiempo para garantizar la correcta formación y funcionabilidad de la red de MTs. En la mayoría de los sistemas estudiados, el mecanismo de nucleación de MTs reside en complejos proteicos que contienen γ -tubulina (Petry and Vale 2015; Sanchez and Feldman 2017) y las denominadas proteínas del complejo de γ -tubulina (GCPs) o proteínas del anillo de γ -tubulina (GRIPs) (Sulimenko et al. 2017).

La γ -tubulina es un miembro altamente conservado en la evolución de la superfamilia de las tubulinas que no se incorpora al polímero del MT (Oakley and Oakley 1989). Por lo general, la proteína se encuentra formando parte de dos complejos conocidos como γ TuSC (*γ Tubulin small complex*) y γ TuRC (*γ Tubulin ring complex*), respectivamente (Sulimenko et al. 2017).

En levaduras, la nucleación de MTs está mediada por el complejo γ TuSC. Este γ TuSC es un complejo

proteico en forma de V de aproximadamente 300 kDa constituido por dos copias de γ -tubulina unidas a una copia de las proteínas GCP2 y GCP3 (Figura I12A). GCP2 y 3 constituyen los brazos de la estructura en forma de V que interaccionan entre sí por sus extremos N-terminal, dejando la región C-terminal libre para el reclutamiento de las dos moléculas de γ -tubulina (Kollman et al. 2008). En el momento de la nucleación, estos complejos se organizan en una estructura a modo de anillo gracias a la interacción con Spc110, generando una plataforma que soporta la incorporación de las moléculas de α -tubulina permitiendo la elongación de los MTs (Kollman et al. 2010) (Figura I12).

En organismos superiores, varias copias del γ TuSC se asocian con otras proteínas tales como GCP4, GCP5 y GCP6 para formar los complejos γ TuRC que reciben este nombre debido a la forma de anillo que presentan (Mourey et al. 2011) (Figura I12). Estos complejos de aproximadamente 2.1 MDa suelen consistir en cinco γ TuSCs y una molécula de cada uno de los GCPs (GCP4-6) unidos a γ -tubulina. Así, el γ TuRC contiene 13 moléculas de γ -tubulina; distribución que encaja perfectamente con la simetría del filamento de MTs (Sulimenko et al. 2017) (Figura I12A). Otras proteínas incluyendo MOZART1, MOZART2a/b (también denominada GCP8), NEDD1 (GCP-WD), LGALS3BP o la quinasa NME7 también han sido identificadas como componentes adicionales del γ TuRC humano (Cota et al. 2017; Teixidó-Travesa et al. 2010; Tovey and Conduit 2018).

En la actualidad, parece claro que el proceso de nucleación de MTs depende de la actividad de los γ TuRCs, la mayoría de los cuales se encuentra en el citoplasma. Sin embargo, el citoplasma carece de actividad para nuclear MTs (Moudjou et al. 1996), por lo que la capacitación de los γ TuRCs para adquirir tal función pasa por su concentración en los diferentes MTOCs (Tovey and Conduit 2018; Zheng et al. 1995).

El reclutamiento de los γ TuRCs a los MTOCs depende de una serie de proteínas denominadas proteínas de unión a γ TuRCs (Tovey and Conduit 2018), la mayoría de las cuales presentan un motivo N-terminal de centrosomina 1 (CM1) que consiste en unos 60 aa (Sawin, Lourenco, and Snaith 2004) capaces de unirse directamente al anillo de proteínas GCP y un dominio C-terminal que permite el anclaje a los MTOCs (Kollman et al. 2010; Tovey and Conduit 2018) (Figura I12B). En mamíferos, estas proteínas son principalmente CDK5Rap2 y su parólogo miomegalina y PCNT y su parólogo AKAP450.

El reclutamiento de estos γ TuRCs a los centrosomas además también implica la presencia de proteínas adicionales tales como CEP192 (Gomez-Ferreria et al. 2007; Takahashi et al. 2002; F. Zhu et al. 2008; Zimmerman et al. 2004) y NEDD1 (aunque ésta última carece de dominio CM1) (Mourey et al. 2011).

Diferentes estudios han demostrado que CEP192 es necesario para el reclutamiento de NEDD1 (Manning et al. 2010; F. Zhu et al. 2008), y que ambas proteínas presentan un papel fundamental en mitosis ya que se hallan implicados en el proceso de maduración del centrosoma al igual que en el establecimiento de un correcto huso bipolar, garantizando la adecuada segregación de los cromosomas (Haren, Stearns, and Lüders 2009). Por su parte, tanto AKAP450 (AKAP350 o CG-NAP) como las dos isoformas de la PCNT (A y B) interaccionan con los componentes GCP2/GCP3 de los γ TuRCs (Gillingham and Munro 2000; Takahashi et al. 2002).

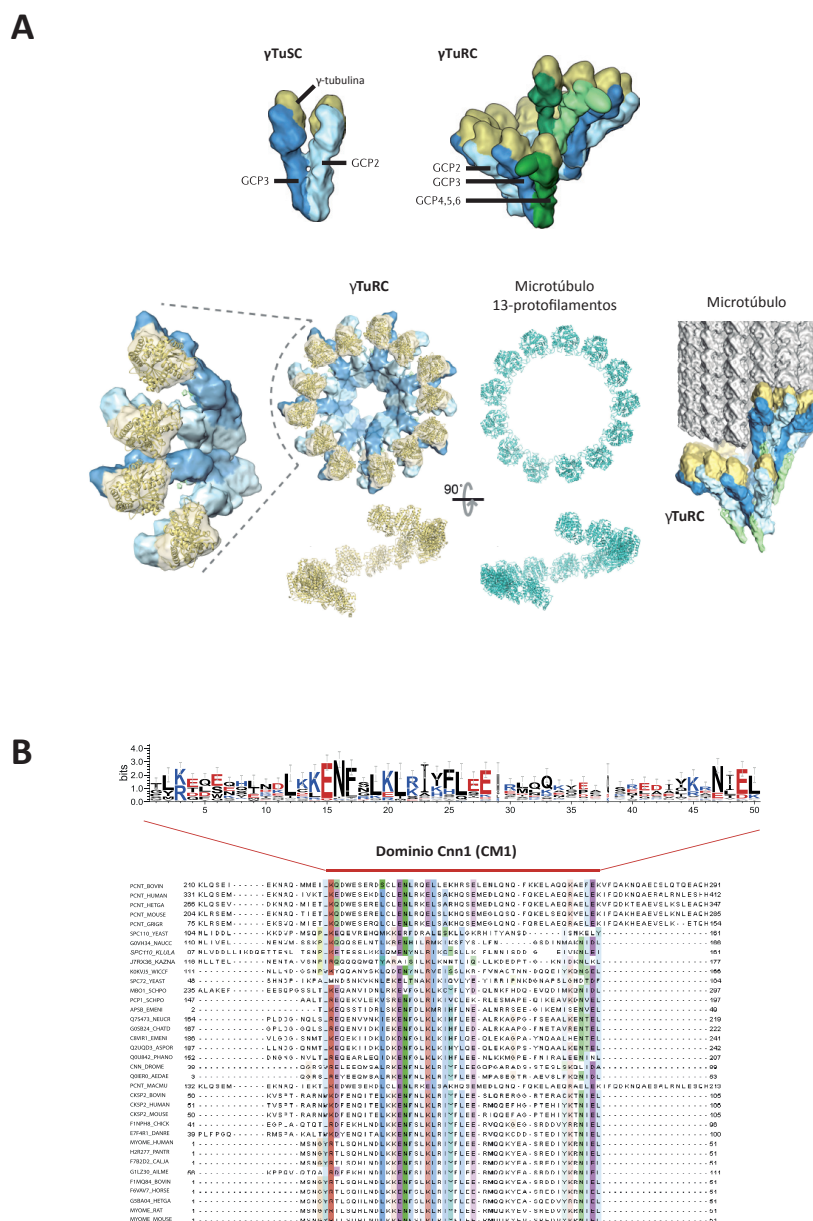


Figura I12. Complejos de nucleación de MTs. Estructura y anclaje a los MTOCs. (A) Representación de la estructura de γ TuSC y γ TuRC. El γ TuSC constituye la estructura básica implicada en la nucleación de MTs en levaduras formado por dos copias de γ -tubulina unidas a GCP2 y GCP3 (las moléculas doradas representan las moléculas de γ -tubulina). El γ TuRC desempeña la misma función en organismos superiores y está constituido por cinco γ TuSCs y una molécula de cada uno de los GCPs (GCP4-6) unidos a γ -tubulina, presentando la distribución idéntica al MT formado por 13 protofilamentos. **(B)** Alineamiento múltiple de proteínas que presentan dominios CM1 en diferentes especies. En la parte superior se muestra la secuencia de aminoácidos consenso correspondiente al dominio CM1 que más se conserva entre distintas proteínas y especies. (Kollman et al. 2015; Lin et al. 2014)

En el caso concreto de CDK5Rap2, la proteína se une directamente a GCP4 a través de un dominio denominado γ TuNA situado en el motivo CM1 y que se ha descrito como un potente activador de la nucleación de MTs (Choi et al. 2010; Fong et al. 2008; Roubin et al. 2013). La eliminación de estas proteínas así como la alteración de alguna de sus interacciones con los complejos γ TuRCs provoca

claros defectos en la nucleación de MTs (Rios 2014).

Varios estudios han demostrado que estas proteínas presentan interacciones entre ellas. Así, AKAP450 interacciona con PCNT y ambas a su vez, se unen a CDK5Rap2 (Barr, Kilmartin, and Gergely 2010; Buchman et al. 2010; Takahashi et al. 2002). Además, su localización al centrosoma también es interdependiente de estas uniones. Por su parte, PCNT permite el reclutamiento de CDK5Rap2 a este MTOC (Buchman et al. 2010; K. Lee and Rhee 2011), mientras que AKAP450 será la encargada de reclutar a miomegalina (Roubin et al. 2013).

Todas éstas, son largas proteínas estructurales (de entre 200 y 450 kDa) que adquieren conformaciones *coiled-coil*, lo cual facilita que se generen fuertes interacciones entre ellas proporcionando así una adecuada estructura a modo de andamio para los diferentes elementos que componen el PCM. Estas propiedades estructurales junto con su habilidad para reclutar γ -tubulina y la interdependencia que presentan para su localización centrosómica sugieren que dichas proteínas son capaces de formar grandes complejos multiproteicos esenciales tanto para la organización del PCM como para los mecanismos de generación, estabilización y nucleación de MTs a lo largo del ciclo celular (Rios 2014).

Como ya hemos indicado, durante la transición de interfase a mitosis, el PCM incrementa su tamaño y capacidad para nuclear MTs en un proceso conocido como maduración del centrosoma (Palazzo et al. 2000) (Figura I11). Tanto en el PCM de interfase como en el centrosoma maduro, el complejo γ TuRC es reclutado desde el citoplasma con el objetivo de nuclear y anclar MTs. Tal y como hemos visto, las tres capas más externas del PCM interfásico presentan dos de los principales reclutadores de γ TuRCs: CDK5Rap2 y NEDD1 (Fong et al. 2008; Lüders, Patel, and Stearns 2006; Manning et al. 2010). NEDD1, al igual que CDK5Rap2, interacciona con γ TuRC y está implicado en el reclutamiento del complejo al centrosoma (Lüders, Patel, and Stearns 2006; Manning et al. 2010). El extremo N-terminal de estas proteínas es necesario para la localización de las mismas al centrosoma; mientras que la región C-terminal es la encargada de interaccionar con el complejo γ TuRC (Haren et al. 2006; Manning et al. 2010). Además de NEDD1, la proteína MOZART, que recientemente ha sido identificada como componente del propio complejo γ TuRC también es necesaria para la nucleación de MTs y el reclutamiento al centrosoma (Cota et al. 2017).

El centrosoma desempeña también un papel importante en el control de la dinámica y el crecimiento de los MTs mediante mecanismos de anclaje y encapuchamiento de estos. La proteína nineína, que se localiza tanto en el PCM como en los apéndices subdistales del centriolo madre, está considerada como uno de los principales elementos de anclaje de MTs (Delgehyr, Sillibourne, and Bornens 2005). La proteína se une al centrosoma por medio de su región C-terminal mientras que en el extremo opuesto recluta elementos de unión a γ -tubulina, habiéndose detectado en complejos proteicos que contienen PCNT y CDK5Rap2 (Delgehyr, Sillibourne, and Bornens 2005; Luo and Pelletier 2014). Del mismo modo, tanto la nineína como la Nlp (*ninein-like protein*) se asocian con los complejos dinactina-dineína (complejos motores implicados en el transporte dirigido a lo largo del MT), que contienen la proteína de unión a MTs p150^{glued}, colaborando así en sus funciones de anclaje de MTs (Casenghi et al. 2003; Delgehyr, Sillibourne, and Bornens 2005). AKAP450 también interacciona con

p150^{glued}, proporcionando mecanismos de anclaje adicionales al PCM (Hurtado et al. 2011; H. S. Kim et al. 2007). Por último, se ha descrito que la proteína CAP350, una proteína centrosómica altamente conservada y con dominios CAP-Gly, parece estar también implicada en el anclaje de MTs. Además, CAP350 es capaz de reclutar FOP al centrosoma, y éste a su vez recluta a EB1 (proteína de unión a extremos (+) del MT). Experimentos de inhibición de alguna de las tres proteínas (CAP350, FOP o EB1) provocan disminución del anclaje de MTs y desorganización de la red radial de MTs en células en interfase (Gavilan et al. 2015; Yan, Habedanck, and Nigg 2006).

Recientemente se han aportado datos que sugieren que proteínas que no forman parte de los complejos γ TuRC son igualmente capaces de favorecer la nucleación de MTs. Se trata de proteínas con dominios Tog, tales como XMAP215, y proteínas homologas de TPX2. Las proteínas con dominios Tog son polimerasas de MTs que regulan el crecimiento de estos mediante la adición longitudinal de dímeros de tubulina, lo que implica la interacción entre los γ TuRCs y los dominios Tog (Flor-Parra, Iglesias-Romero, and Chang 2018; Lüders 2018; Roostalu, Cade, and Surrey 2015; Thawani, Kadzik, and Petry 2018; Wieczorek et al. 2015; Woodruff et al. 2017). Por su parte, las proteínas tipo TPX2, se unen de manera longitudinal al lateral del MT en crecimiento favoreciendo la estabilidad y robustez del mismo y otorgando mayor eficiencia al mecanismo de nucleación (R. Zhang et al. 2017).

2.3. El Aparato de Golgi (AG)

El AG es el orgánulo central de la vía secretora en células eucariotas, desempeñando funciones esenciales para el crecimiento, la homeostasis y la división celular (Rios 2014). Aunque sus funciones básicas están altamente conservadas, el AG varía notablemente en forma, estructura y número de unos organismos a otros.

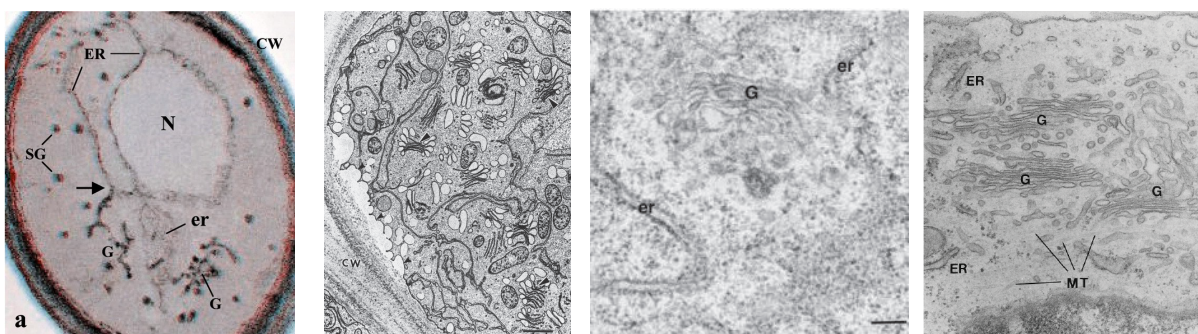


Figura 113. Estructura del AG en células eucariotas. Imágenes de microscopía electrónica (ME) de la estructura del AG en células eucariotas. De izquierda a derecha se muestra el AG de: levaduras (cisterna simple), plantas (dictiosomas), *Drosophila* (dictiosomas) y mamíferos ("Golgi Ribbon"). Imágenes tomadas de (Dupree and Sherrier 1998; V. Kondylis et al. 2001; Peyroche et al. 2001; Thyberg and Moskalewski 1999).

En los eucariotas más primitivos como *Saccharomyces cerevisiae* este orgánulo toma la forma de sáculos o cisternas aplanadas individualizadas y dispersas por todo el citoplasma (Preuss et al. 1992). Posteriormente en la evolución, estas cisternas se alinearon en paralelo formando dictiosomas,

que en número variable aparecen repartidos por el citoplasma, como ocurre en plantas (Hawes and Satiat-Jeunemaitre 2005) o en invertebrados como *Drosophila* (Vangelis Kondylis and Rabouille 2003). En todos estos casos, cada pila de cisternas se asocia a un sitio de salida de proteínas del Retículo Endoplásmico (RE) “ER exit site” (ERES), formando una unidad secretora. En vertebrados, cientos de estos dictiosomas se fusionan formando un orgánulo único, conocido como “*Golgi ribbon*”, que en células no polarizadas se localiza cerca del núcleo y rodeando al centrosoma (Rios and Bornens 2003) (Figura I13).

En células de mamífero, el AG está constituido generalmente por entre 40 y 100 pilas de cisternas aplanadas que aparecen interconectadas mediante un sistema tubular de membranas que presenta un alto grado de dinamismo. Las pilas de cisternas están polarizadas tanto estructural como morfológicamente (Képès, Rambourg, and Satiat-Jeunemaitre 2004). Así, en cada pila, se pueden distinguir una cara *cis* (más próxima al retículo endoplásmico) y otra *trans* orientada hacia la membrana plasmática. Dichas pilas de cisternas llevan asociadas redes de estructuras de membrana tubulares conocidas como la red *cis*-Golgi (CGN) y la red *trans*-Golgi (TGN), que representan los puntos de entrada y salida del cargo respectivamente (Gosavi and Gleeson 2017). (Figura I14)

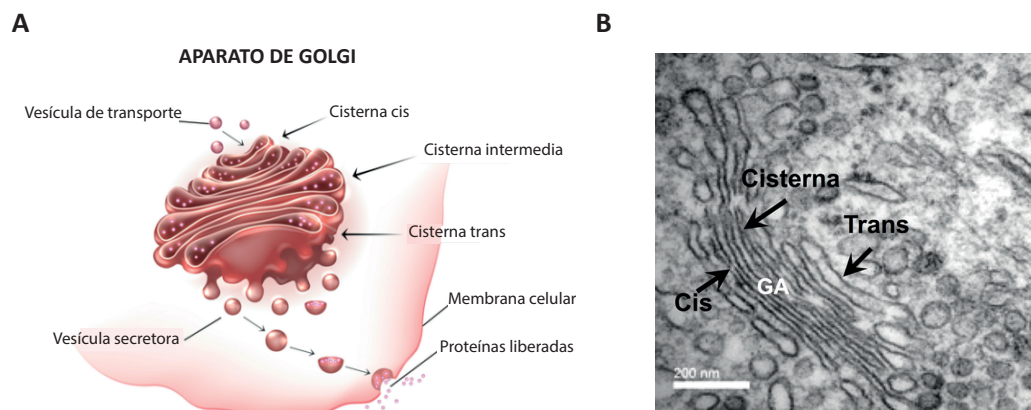


Figura I14. Aparato de Golgi en células de mamífero: *Golgi Ribbon*. (A) Representación esquemática de la estructura de Golgi Ribbon donde se observan las diferentes cisternas de la cara cis, media y trans. Se indica también la ruta de transporte vesicular. (B) Imagen de microscopía electrónica (ME) del *Golgi Ribbon* de células de mamífero. Imágenes tomadas de (Sahu et al. 2019; Soediono 1989) y www.significados.com/aparato-de-golgi.

En este sentido, el AG debe mantener esta estructura de apilamiento en forma de cisternas ordenadas para garantizar las correctas modificaciones post-traduccionales de las moléculas y para promover la clasificación y el tráfico eficientes de las proteínas secretoras. Esta organización se pierde durante la división celular, donde el *Golgi ribbon* en primer lugar se fragmenta en dictiosomas individualizados que posteriormente se separan en cisternas aisladas y vesículas. Estas membranas de Golgi se reparten entonces en las dos células hijas donde se re-ensamblan de nuevo para formar un único *Golgi ribbon* después de citoquinesis (Ayala and Colanzi 2017).

El citoesqueleto de MTs tiene un papel esencial tanto en la integridad del AG como un orgánulo

único como en su posición pericentrosomal (Thyberg and Moskalewski 1999). Ambas características, integridad y posición, se pierden cuando experimentalmente se induce la despolimerización de MTs usando drogas como el nocodazole (NZ). En ausencia de MTs, el *Golgi ribbon* se fragmenta dando lugar a elementos, conocidos como *Golgi-ministacks*, que aparecen dispersos por toda la célula (Cole et al. 1996; Thyberg and Moskalewski 1999). Además de ser dependiente del citoesqueleto de MTs, ambas propiedades dependen de los motores moleculares (Yadav and Linstedt 2011), y más concretamente del complejo dineína/dinactina que trasporta cargos (como pueden ser las membranas de Golgi) desde la periferia de la célula hasta el centrosoma, es decir, hacia los extremos (–) de los MTs.

La dineína es un complejo proteico multimérico compuesto por cadenas pesadas (DHC, que son los dominios motores), intermedias (DIC) y ligeras (DLC), de las que a su vez pueden existir varias isoformas. Una gran cantidad de estudios han mostrado que este complejo es fundamental para la integridad y posición del AG. En primer lugar, la inhibición de la dineína-1 (aquella formada por la isoforma 1 de la cadena pesada o *dynein heavy chain 1* -DHC1-) provoca la fragmentación del Golgi en dictiosomas dispersos como ocurre en blastocitos aislados de ratones knock-out de la DHC1 (Harada et al. 1998). En segundo lugar, la microinyección de anticuerpos bloqueantes frente a la DIC dan lugar a la dispersión del AG (Burkhardt et al. 1997) y además experimentos de siRNA han mostrado que la ausencia de la mayoría de los componentes de dineína-1 son necesarios para mantener la estructura del Golgi (Palmer, Hughes, and Stephens 2009).

Muchas de las funciones mediadas por la dineína requieren la actividad de un complejo adicional, el complejo dinactina, que funciona en la unión al *cargo* y en la procesividad del motor (Schroer 2013). El complejo dinactina contiene 11 subunidades organizadas en una elaborada estructura. Las subunidades mejor caracterizadas son el filamento Arp1 que se sitúa en la base del complejo, p150^{glued} que se une directamente a la dineína y p50/dinactina, esencial para mantener la integridad del complejo. La expresión de un mutante dominante negativo de p150^{glued}, así como la sobreexpresión de la dinactina inducen la fragmentación del Golgi y su dispersión por todo el citoplasma, de forma similar a como ocurre en células tratadas con NZ. En todos estos casos, los fragmentos de Golgi conservan su organización en cisternas y son funcionales para la secreción. Por tanto, la capacidad para formar un “*Golgi stack*” parece ser una propiedad intrínseca de las membranas del AG y no requiere MTs. Estos son, sin embargo, necesarios para conectar los “*stacks*” entre ellos y así generar un orgánulo único y para asegurar su localización central en torno al centrosoma.

2.3.1. El Aparato de Golgi como MTOC

Además de su papel en la vía secretora, el AG representa el segundo MTOC en las células de mamífero y participa tanto en la nucleación como en el anclaje de MTs.

Chabin-Brion y sus colaboradores (Chabin-Brion et al. 2001) mostraron por primera vez en 2001 que las membranas de Golgi eran capaces de nuclear MTs, usando experimentos de repolimerización de MTs después de un tratamiento con NZ en células hepáticas. Tras el lavado de la droga, los MTs aparentemente se originaban en la vecindad de los fragmentos de Golgi y además estos MTs eran

estabilizados de forma muy temprana. La reconstrucción *in vitro* del ensamblaje de MTs desde membranas purificadas de Golgi mostraba que esta nucleación era dependiente de γ -tubulina, que factores citosólicos adicionales eran necesarios para la estabilización de esos MTs y ya apuntaban a que otras proteínas periféricamente asociadas al Golgi se necesitarían para soportar el proceso de nucleación.

Pruebas adicionales de un papel directo del AG en la nucleación de MTs vinieron del análisis de citoplastos (fragmentos de célula anucleados que se obtienen tras un tratamiento con drogas despolimerizantes del citoesqueleto de actina y tubulina, y posterior centrifugación). En los citoplastos desprovistos de centrosoma, una red de MTs radial se formaba y se localizaba en el centro de una forma dependiente del motor dineína. Curiosamente, el AG bajo estas circunstancias se encontraba muy próximo al foco del áster de MTs, en el centro del citoplasto (Malikov et al. 2005).

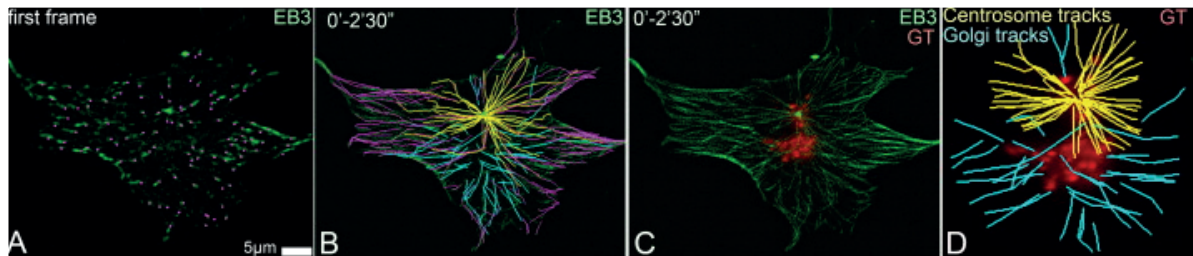


Figura I15. El AG actúa como un MTOC adicional. (A-D) Detección de los MTs nucleados desde el AG en células RPE1 transfectadas con las construcciones GFP-EB3 (extremo (+)) y mCherry-GT (AG) mediante microscopía *time lapse*. (A-B) Cometas de GFP-EB3. Imagen superpuesta de los cometas de GFP-EB3 mostrando la trayectoria de los MTs. (C-D) Imagen superpuesta de los cometas de GFP-EB3 y el marcaje de mcherry-GT. Se aprecia claramente como además de nucleación desde el centrosoma (trayectorias en amarillo), también hay MTs que están siendo nucleados desde la superficie del AG (trayectorias azules). Tomada de (Efimov et al. 2007)

Pero la demostración inequívoca de la capacidad de nucleación de MTs por parte del AG vino en 2007 de la mano del grupo de Kaverina (Efimov et al. 2007), en experimentos de ablación con láser del centrosoma en células primarias. Siguiendo *in vivo* las trayectorias de los MTs que estaban siendo nucleados en un determinado periodo de tiempo, gracias a la fluorescencia de GFP-EB3, observaron que un porcentaje de estos se originaban desde un sitio discreto separado del centrosoma. La superposición de estas trayectorias con el marcador de Golgi GT (*galactosyl transferase*) reveló que estos MTs no centrosomales crecían desde el AG, lo que era particularmente obvio en células donde el centrosoma y el Golgi se encontraban espacialmente separados (Figura I15). Experimentos de repolimerización después de NZ tanto *in vivo* como en células fijadas confirmaron que la mayoría de los MTs que se originaban fuera del centrosoma se detectaban asociados a las membranas de Golgi, que en este caso se encontraban dispersas por todo el citoplasma. Otros hallazgos importantes de este estudio fueron que la nucleación de MTs desde el AG era dependiente de γ -tubulina (ya que la inhibición de su expresión mediante siRNA inhibía la nucleación tanto del AG como del centrosoma) y que también requiere de la actividad estabilizadora de MTs de las proteínas CLASPs (CLASP1 y CLASP2)

que son reclutadas a las membranas de Golgi mediante su interacción con la golgina de la cara *trans* GCC185. Además, los autores estimaban que aproximadamente la mitad de los MTs de una célula RPE1 en interfase se originaban en el AG.

Sin embargo, ninguno de estos estudios identificaba la maquinaria molecular necesaria para la nucleación de MTs desde el AG. En 2009, experimentos de nuestro laboratorio (Rivero et al. 2009) revelaron que la proteína AKAP450 es clave en este proceso. Los experimentos demostraron que AKAP450 (que también se localiza en el PCM) es reclutada a la cara *cis* del AG mediante su interacción con GM130 y de una forma independiente de MTs. La inhibición de la expresión de la fracción de AKAP450 asociada al AG mediante siRNA (que en condiciones normales es muy poco eficaz para eliminar el pool asociado al centrosoma) elimina completamente la nucleación de MTs asociada al mismo (Figura I16). Además, la desorganización de la red de AKAP450 y su disociación de las membranas de Golgi mediante la desaparición de GM130, también disociaba la capacidad de nuclear MTs del AG. Experimentos posteriores también de nuestro laboratorio (Hurtado et al. 2011) identificaron el dominio de interacción con GM130 de AKAP450 situándolo en la región N-terminal, más concretamente en los primeros 300 aa que coinciden con el primer segmento *coiled-coil* de la proteína (fragmento que los autores denominaron AK1B). La expresión de este dominio, que actúa como un dominante negativo, disociaba AKAP450 de las membranas de Golgi y suprimía la nucleación de MTs desde el mismo, sin afectar a la nucleación desde el centrosoma, confirmando la implicación de AKAP450 en la nucleación de MTs desde el AG (Figura I17). Todos estos resultados en su conjunto apoyaban un modelo en el cuál, el reclutamiento de AKAP450 a la cara *cis* del AG permitiría a este orgánulo convertirse en un sitio preferencial para la nucleación de MTs.

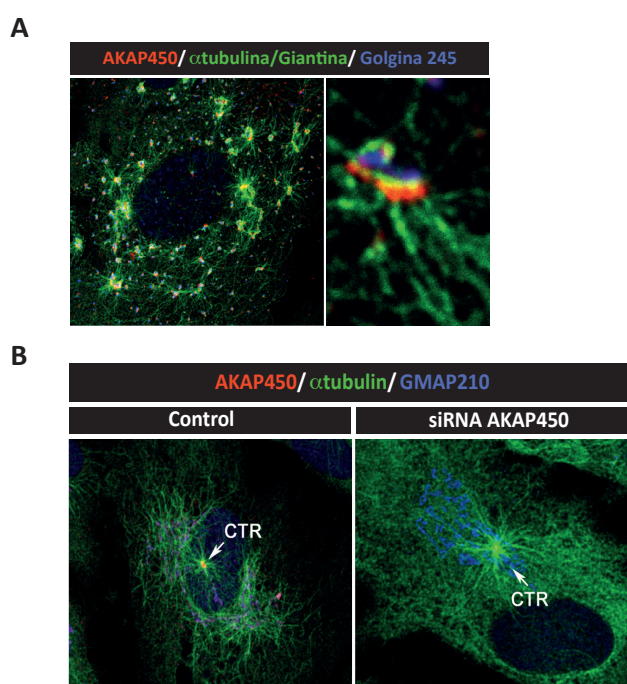


Figura I16. La nucleación de MTs desde el AG es dependiente de AKAP450. (A) Imágenes de microscopía confocal de células RPE1 WT sometidas a un ensayo de repolimerización tras tratamiento con nocodazole. En la imagen ampliada de la derecha se observa como AKAP450 se sitúa en la cara *cis* del AG, coincidiendo con el marcaje de α -tubulina. **(B)** Tras la despolimerización de MTs inducida por la incubación de las células en hielo, se llevó a cabo la reincubación de las mismas a 37°C. En apenas un minuto aparecen ya MTs. EN el caso de las células controles, estos MTs surgen tanto del centrosoma como del AG. Sin embargo, en las células carentes de AKAP450 (siRNA AKAP450), sólo se aprecia nucleación desde el centrosoma (CTR). Modificada de (Rivero et al. 2009)

Es importante destacar que otras proteínas reclutadoras de γ TuRCs, CDK5Rap2 y Miomegalina, han sido identificadas en el *cis*-Golgi de forma dependiente de AKAP450 (Roubin et al. 2013; Wang et al. 2010; Wang, Zhang, and Qi 2014). CDK5Rap2 es una proteína presente tanto en el PCM como en el AG y que como ya hemos descrito, es capaz de unir complejos de γ -tubulina a través del dominio activador γ TuNA (Choi et al. 2010). Ya que se ha descrito como implicada en el anclaje de γ -tubulina al centrosoma (Fong et al. 2008), es posible que juegue un papel similar en el AG. Por su parte, miomegalina es un parólogo de CDK5Rap2 en vertebrados, con niveles altos de expresión en músculo, de la que existen varias isoformas, alguna de las cuales se ha identificado en el AG (Verde et al. 2001) (para más detalles de estas dos proteínas consultar apartados 3.3 y 3.4 de la Introducción). Si se interfiere la función de alguna de esas proteínas directa o indirectamente se altera la nucleación de MTs desde el Golgi, el transporte del RE al AG o la propia estructura del AG.

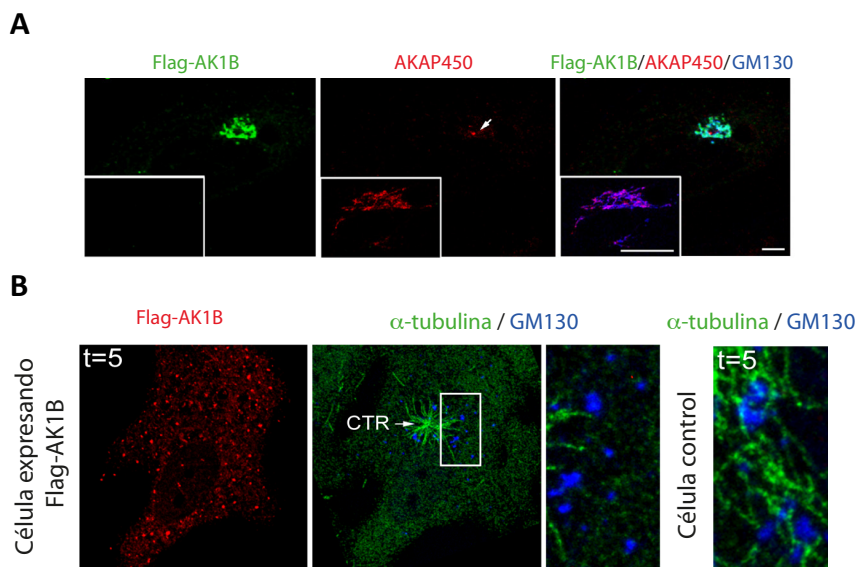


Figura I17. La expresión de un dominante negativo de AKAP450 afecta a la morfología y posición del AG y a la nucleación de MTs derivada de este. (A) Células RPE1 expresando flag-AK1B (un dominante negativo que desplaza a AKAP450 del AG, pero no del centrosoma) marcadas con anticuerpos anti-FLAG (verde), anti-AKAP450 (rojo) y anti-GM130 (azul). Se muestra tanto el marcaje simple como el triple marcaje. Los recuadros inferiores corresponden a células controles que no expresan flag-AK1B. Nótese que la expresión del dominante negativo provoca

la deslocalización de la proteína endógena del AG, pero no del centrosoma. Además, se aprecia como el AG aparece notablemente más compactado que en las células controles. **(B)** Células RPE1 controles o que expresaban flag-AK1B fueron sometidas a experimentos de repolimerización de MTs tras tratamiento con NZ. Al tiempo indicado (5 minutos), las células fueron fijadas y marcadas con anticuerpos anti-FLAG (rojo), anti- α -tubulina (verde) y anti-GMAP210 (marcador de Golgi, azul). El marcaje simple para FLAG es mostrado a la izquierda y a la derecha el doble marcaje α -tubulina-GMAP210. El recuadro aparece magnificado justo al lado. En el caso de las células controles sólo se muestra el doble marcaje α -tubulina-GMAP210 amplificado. Se observa como las células que expresan FLAG-AK1B no presentan nucleación desde las membranas del AG, consecuencia del desplazamiento de la proteína AKAP450 endógena de esta localización. Modificado de (Hurtado et al. 2011)

Hay que mencionar que todas estas proteínas (γ -tubulina, AKAP450, CDK5Rap2 y Miomegalina) poseen un pool citoplásmico importante, por lo que es probable que estos complejos proteicos se hagan competentes para anclaje de γ TuRCs y la nucleación de MTs sólo después de que se ensamblen en la superficie de las membranas del AG (o en el centrosoma), con el fin de evitar una nucleación citoplásmica de MTs desordenada y aleatoria por todo el citoplasma. En línea con esto, GM130 carece de un pool citoplásmico (Ríos et al. 2004), por lo que parece un candidato firme al control de la

localización/activación de los elementos implicados en el proceso (al menos en el AG).

Los MTs que están siendo nucleados en el *cis*-golgi necesitan ser estabilizados para evitar que se desensamblen, lo que permitiría la formación de una red corta de MTs en el área del AG, tal y como ocurre en la mayoría de tipos celulares. Como se puso de manifiesto en el trabajo de Kaverina y colaboradores (Efimov et al. 2007), las proteínas CLASPs parecen ser fundamentales en este proceso. Mientras que AKAP450 se localiza en la cara *cis* del AG, las CLASPs están asociadas a su cara *trans*, por lo que la forma en que los diferentes complejos proteicos dependientes de AKAP450 y CLASPs cooperan en la formación de la subpoblación de MTs derivada del Golgi es, cuanto menos, intrigante. Una posibilidad sería que semillas de MTs que son nucleadas en la cara *cis* se relocalicen a la cara *trans* donde son estabilizadas por las proteínas CLASPs. Esto generaría MTs cortos en el área del AG y paralelos a las cisternas del *ribbon*, lo que podría favorecer la fusión de los dictiosomas para formar un orgánulo único. De hecho, mientras que los MTs originados en el centrosoma tienen una disposición radial, los que derivan del AG son predominantemente tangenciales (X. Zhu and Kaverina 2013). Alternativamente, las CLASPs estabilizarían sólo aquellos MTs que se extienden hacia la cara *trans* desde sus sitios de nucleación en la cara *cis*, lo que se apoyaría en el hecho de que la mayoría de los MTs derivados del AG se dirigen hacia el frente de avance de las células en migración (Efimov et al. 2007). Aquellos MTs que se originan en la cara *cis* en regiones distantes de la TGN, serían de este modo inestables en ausencia de la capacidad estabilizadora de las CLASPs y se despolimerizarían (Figura I18).

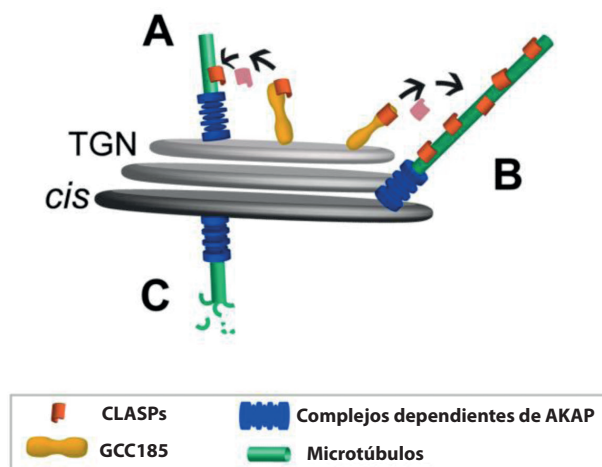


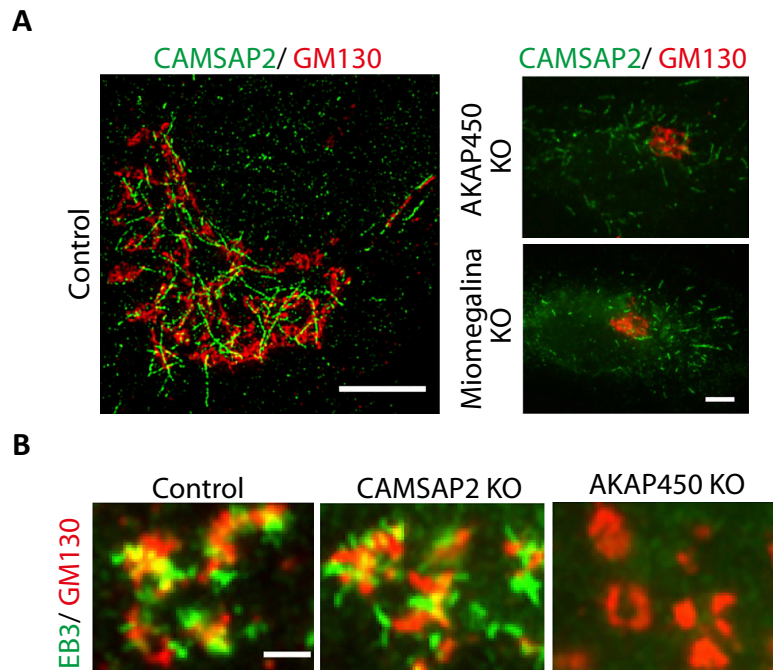
Figura I18. Modelo de los potenciales sitios y mecanismos de nucleación de MTs en las cisternas del AG. (A) MTs nucleados desde la cara *cis* por complejos dependientes de AKAP450 pueden ser translocados a la región TGN donde sería estabilizados por proteínas CLASPs. (B) Proteínas situadas en la región *cis* y *trans* del Golgi actúan de manera conjunta interviniendo en la nucleación y estabilización de MTs. (C) MTs que son nucleados por complejos dependientes de AKAP450 desde localizaciones de la cara *cis* lejanas a la TGN presentarían una baja estabilidad debido a la ausencia de proteínas CLASPs. Modificado de (X. Zhu and Kaverina 2013)

Otra alternativa ha sido propuesta por Sato y su colaboradores (Sato et al. 2014), quienes apoyarían la existencia de una conexión física entre AKAP450 y las propias CLASPs. Los autores han descrito que MTCL1 (*Microtubule cross-linking factor 1*), una proteína que se une lateralmente a los MTs y los estabiliza, se localiza en las membranas del AG. La inhibición de la expresión de MTCL1 parece alterar la red de MTs asociada al Golgi, además de producir un colapso del mismo alrededor del centrosoma. Experimentos de rescate demuestran que además de la actividad de entrecruzamiento o “crosslinking” mediada por la región N-terminal de unión a MTs de la proteína, la región C-terminal

también sería importante para la función de ésta, ya que contiene una actividad estabilizadora de MTs hasta el momento desconocida. Pero lo más interesante es que la interacción de MTCL1 con el AG es dependiente tanto de AKAP450 como de las CLASPs, por lo que los autores proponen que MTCL1 regularía la formación estable de MTs desde el AG actuando conjuntamente con estas dos proteínas.

Otro elemento importante en este proceso es CAMSAP2, que forma segmentos o tramos de 1-2 μm de longitud en los extremos (-) de los MTs, evitando la despolimerización de estos y sirviendo como fuente para la extensión de los extremos (+) (Jiang et al. 2014). Experimentos del laboratorio de Akhmanova (Wu et al. 2016) han demostrado recientemente, mediante la generación de líneas celulares knock-out con la tecnología CRISPR/Cas9 y combinándola con experimentos de rescate, que estos segmentos de MTs decorados con CAMSAP2 se anclan a las membranas de Golgi mediante la formación de un complejo con AKAP450 y miomegalina (Figura I19). Los autores demuestran que las proteínas CLASPs serían necesarias para la estabilización de estos segmentos de MTs, pero no para la unión de éstos a las membranas de Golgi.

Figura I19. Los MTs decorados con CAMSAP2 se localizan en la membrana del AG mediante un mecanismo dependiente de AKAP450 y miomegalina. AKAP450, pero no CAMSAP2, está implicada en la nucleación de MTs desde el AG. **(A)** Células RPE1 controles, *akap450* KO y *miomegalina* KO fueron marcadas con anticuerpos anti-CAMSAP2 (verde) y anti-GM130. Nótese como la ausencia de AKAP450 y miomegalina provocan la deslocalización del marcaje de CAMSAP2 de la superficie del AG. **(B)** Células RPE1 controles, *akap450* KO y *camsap2* KO fueron sometidas a ensayos de repolimerización tras tratamiento con NZ y marcadas con anticuerpos anti-EB3 (+TIPs, verde) y anti-GM130 (rojo). Se muestran imágenes amplificadas. Obsérvese como la ausencia de CAMSAP2 no afecta a la nucleación de MTs desde el AG al contrario de lo que ocurre con AKAP450. Modificado de (Wu et al. 2016).



También concluyen, de acuerdo a lo previamente descrito (Rivero et al. 2009), que AKAP450 es esencial para la nucleación de MTs desde el AG asignándole un papel dual en la formación de estos. Por un lado, promovería el reclutamiento de γ TuRCs a las membranas de Golgi y por otro, anclaría los extremos (-) unidos a CAMSAP2. Tanto miomegalina como CDK5Rap2 facilitarían esta nucleación, pero no serían imprescindibles para la misma. Por su parte, CAMSAP2 sería esencial para el anclaje, pero no para la nucleación de MTs desde el AG, de forma que MTs originados en el centrosoma o en el AG que

hubieran perdido su “capuchón” de γ TuRCs, podrían ser estabilizados por CAMSAP2 y anclados a las membranas de Golgi a través de este mecanismo (Figura I19).

Para hacer este escenario más complejo, las proteínas conocidas como reclutadoras de γ TuRCs también podrían contribuir a la nucleación/estabilización de MTs por mecanismos adicionales. Por ejemplo, AKAP450, como ya hemos indicado, interacciona con la subunidad p150^{glued} de la dineína. El lugar de interacción con p150^{glued} se ha localizado en la región N-terminal, cerca del dominio de interacción con el Golgi. Cuando se expresa un fragmento que contiene ambos sitios de interacción, que también se localiza en el AG, se desplaza a la proteína endógena del mismo. Curiosamente, este mutante truncado también decora los MTs citoplásmicos, sugiriendo que AKAP450 podría unirse a los MTs mediante la unión a p150^{glued}. Estos resultados, junto con el hecho de que bloqueando la actividad del complejo dineína/dinactina se altera la nucleación de MTs desde el AG (Rivero et al. 2009), apoyaría que AKAP450 participa en la formación de MTs desde el Golgi de muchas maneras. Por su parte, se ha descrito que tanto CDK5Rap2 como una de las isoformas de miomegalina que se ha descrito en RPE-1 (EB-MMG, ver apartado 3.4 de la introducción) pueden unirse a los extremos en crecimiento de los MTs, mediante su asociación con EB1 y que de esta forma regularían la dinámica de los extremos (+) de los MTs (Fong et al. 2009; Roubin et al. 2013). Además, trabajos recientes (Yang et al. 2017) han sugerido que la formación de un complejo EB1/EB3-miomegalina resulta esencial para la co-organización de los MTs derivados del AG así como en el mantenimiento del “Golgi ribbon”, al actuar a modo de punto de anclaje entre MTs-membranas de Golgi y contrarrestar la compactación de las cisternas mediada por dineína.

En un artículo reciente Sanders y sus colaboradores (Sanders et al. 2017) han propuesto que la geometría de la red de MTs derivada del Golgi se basa en que la nucleación no es homogénea a lo largo de toda su superficie, sino que se concentra en una serie de dominios especializados en la membrana o “puntos calientes” (*hotspots*), donde también se concentrarían las actividades de nucleación y estabilización. Mediante el uso de microscopía confocal *spinning disk* han seguido la distribución de la nucleación de microtúbulos en el AG y han realizado un mapa de los sitios de nucleación. Los resultados muestran que los microtúbulos se formaban muy cerca unos de otros (más del 50% de los MTs que se formaban lo hacían a una distancia menor de 0,6 μ m de otro MT) y que además cada grupo de MTs se formaba dentro de un corto periodo de tiempo (dentro de unos 25s), después de lo que no se volvía a observar más nucleación desde ese mismo sitio, sugiriendo que la nucleación desde el AG estaría de esta forma restringida tanto en tiempo como en espacio (Figura I20).

Estos “puntos calientes” o preferentes de nucleación de MTs en el Golgi podrían formarse mediante dos mecanismos, según los autores. En un escenario, cuando un microtúbulo es nucleado, este podría a su vez reclutar a otros factores nucleadores o estabilizadores al mismo lugar del Golgi, promoviendo la nucleación de nuevos MTs (hipótesis cooperativa). Alternativamente, lugares específicos en la membrana del Golgi se enriquecerían en factores nucleadores y estabilizadores independientemente de la presencia de MTs, lo que permitiría la formación de varios *clúster* o puntos calientes de nucleación al mismo tiempo (hipótesis del Golgi heterogéneo). Finalmente, los autores usan una serie de simulaciones computacionales, tras lo que concluyen que la hipótesis cooperativa

es la que más se ajustaría a los datos cuantitativos, aunque no excluyen la posibilidad de que haya una mezcla de ambas.

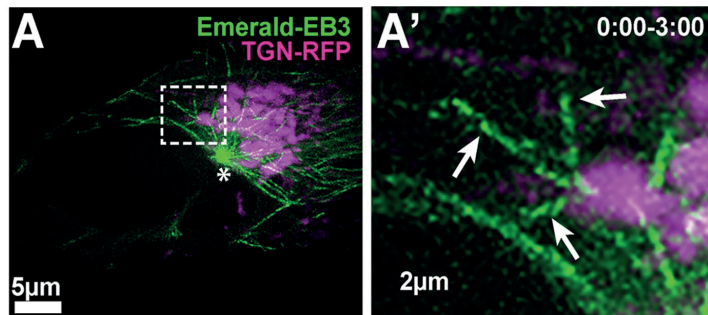


Figura 120. Los MTs derivados del AG son nucleados desde puntos discretos específicos en el Golgi Ribbon. (A) Células RPE1 expresando Emerald-EB3 (proteína +TIP, verde) y TGN-RFP (marcador del AG, magenta). Se observa nucleación de MTs desde el centrosoma y el AG. **(A')** Amplificación del recuadro de (A) en la que se muestra como nuevos MTs están siendo nucleados desde el mismo punto situado en la superficie del AG. Las flechas apuntan a los MTs en formación. Modificado de (Sanders et al. 2017)

2.3.1.1. Funciones de los microtúbulos nucleados desde el AG

Diversos estudios han demostrado que los MTs derivados del AG participan en una gran variedad de procesos celulares tales como el re-ensamblaje de éste tras la salida de mitosis, la migración celular, la secreción polarizada o la ciliogénesis.

Las primeras evidencias de que estos MTs presentaban funciones específicas proceden de los estudios de re-ensamblaje del AG tras tratamiento con nocodazole, llevados a cabo por el grupo de Kaverina (Miller et al. 2009). Los autores observaron que este re-ensamblaje ocurre en dos fases diferentes. En primer lugar, mini-cisternas de Golgi se fusionan entre sí dando lugar a elementos de mayor tamaño en la periferia de la célula. A continuación, estos “clusters” periféricos son transportados al centro de la célula donde se interconectan dando lugar al *Golgi ribbon*. Los MTs derivados del AG resultan ser esenciales para la primera fase del proceso, ya que al inhibir la nucleación desde esta localización, la célula sí es capaz de formar un Golgi circular entorno al centrosoma, pero éste se encuentra altamente fragmentado (Hurtado et al. 2011; Miller et al. 2009). Estos resultados indicaban que los diferentes elementos de Golgi pueden ser transportados al centro de la célula en ausencia de MTs derivados del AG (seguramente gracias a la nucleación centrosómica), pero que estos MTs son fundamentales para la fusión de los diferentes fragmentos y la formación de un adecuado *Golgi ribbon*. Mecanismo esencial en el re-ensamblaje del Golgi tras la salida de mitosis (Maia et al. 2013; Miller et al. 2009).

Diversos estudios han enfatizado la asimetría intrínseca de los haces de MTs derivados del AG (Efimov et al. 2007; Miller et al. 2009; Rivero et al. 2009). Esta asimetría es esencial para la adecuada organización de las células polarizadas que, a su vez, resulta clave en los mecanismos de migración celular. Las células que carecen de MTs derivados del Golgi migran más lentamente en ensayos de cierre de herida, a pesar del correcto posicionamiento pericentrosomal del AG y la adecuada reorientación coordinada tanto del centrosoma como de éste hacia el frente de avance (Hurtado et al. 2011; Rivero

et al. 2009). Esto indica que, los MTs derivados del AG resultan actores importantes en la regulación de la migración direccional, probablemente al establecer rutas de secreción preferenciales hacia el frente de avance de células en migración. De hecho, en consistencia con esto, sólo la secreción direccional, pero no el mecanismo de secreción en sí, se ve afectado en estas condiciones.

Cabe señalar que interrumpir la asociación Golgi-centrosoma tiene un efecto negativo mucho más marcado sobre la polaridad y la migración celular que la simple inhibición de la nucleación de MTs desde el AG (Hurtado et al. 2011). De hecho, la dislocación del eje de polaridad inducida por la expresión del extremo N-terminal de AKAP450 (dominante negativo) da como resultado no solo una tasa de migración reducida, sino también un patrón de migración aberrante con células que se mueven en direcciones aleatorias (Hurtado et al. 2011). Esta afirmación coincide con la evidencia previa de que las células en migración requieren un AG adecuadamente polarizado y cerca del centrosoma para asegurar un correcto tráfico direccional y una migración dirigida (Millarte and Farhan 2012).

Además, el AG desempeña un papel esencial en la formación del cilio primario, estructura que emana de la superficie celular de cierto tipo de células de mamíferos en G0 (a partir del centriolo madre), muy implicado en vías de señalización. Se sabe que la formación y el mantenimiento de esta estructura son altamente dependientes del tráfico de vesículas (Pitaval et al. 2010) y que tanto la integridad como el correcto posicionamiento pericentrosomal del AG son esenciales para el establecimiento del cilio primario en células epiteliales (Hurtado et al. 2011).

2.3.1.2. Nucleación de MTs desde el AG en células diferenciadas.

Los mecanismos de diferenciación celular implican importantes cambios en la morfología de la célula, así como en la arquitectura subcelular. En el caso de las células musculares y neuronales, el AG desempeña un papel esencial en la reorganización del citoesqueleto de MTs durante esa diferenciación (Oddoux et al. 2013; Ori-McKenney, Jan, and Jan 2012).

Nucleación desde el AG en células musculares

La reorganización de la arquitectura celular durante la diferenciación de las células de músculo esquelético implica una completa y simultánea remodelación de la actividad del centrosoma, la red de MTs y del propio sistema secretor de la célula. Esta reorganización se estudió inicialmente en mioblastos en los que de manera *in vitro* se inducía su diferenciación a miotubos multinucleados. Los mioblastos presentan una red de MTs clásica de células no diferenciadas con el centrosoma situado junto al núcleo y rodeado por el AG, mientras que los miotubos poseen numerosos haces de MTs con una organización paralela y sin ningún centro de nucleación específico. Los primeros estudios sobre la transición de un estado a otro se llevaron a cabo por el grupo de Bornens (A. M. Tassin, Maro, and Bornens 1985; Anne Marie Tassin et al. 1985). Los autores describen que, durante la diferenciación de los miotubos, tanto el PCM como el AG se redistribuyen a la superficie de la envuelta nuclear donde forman estructuras a modo de cinturones perinucleares que contenían pericentrina, γ -tubulina y nineína. Sin embargo, observaron que la nucleación de nuevos MTs no solo ocurre en esos anillos perinucleares, sino que también se originan en forma de ásteres desde estructuras citoplásmicas. En la mayoría de los casos,

estas estructuras coincidían con elementos de Golgi que no solo se disponían en torno al núcleo, sino que en los miotubos fusionados también se distribuyen a lo largo de toda la superficie de estos (Bugnard, Zaal, and Ralston 2005; Zaal et al. 2011).

Gracias al uso de microscopía confocal y de superresolución, el grupo de Ralston demostró, ya en fibras musculares, que esos MTs son altamente dinámicos y forman pequeños haces capaces de constituir una red estable (Oddoux et al. 2013). Describen que, estructuras estáticas del AG que se localizan en las intersecciones de los diferentes haces de MTs, constituyen los principales sitios de nucleación en estas células (junto a la envuelta nuclear) generando una red ortogonal característica. En este caso, fueron capaces de detectar la presencia de PCNT y γ -tubulina, pero no AKAP450.

Nucleación desde el AG en células neuronales

Las neuronas constituyen una de las células más complejas y altamente polarizadas en animales. El mecanismo de nucleación de MTs resulta esencial para dicho proceso de diferenciación que implica la formación del axón y las dendritas (Kuijpers and Hoogenraad 2011). Aunque el mecanismo concreto de cómo se genera la matriz de MTs en estas células polarizadas no se conoce con exactitud, se propuso que los MTs nucleados desde el centrosoma son liberados y desde ahí se transportan hacia la localización específica. Alternativamente, estos MTs podrían experimentar modificaciones en la periferia de la células donde servirían a modo de andamios para diferentes mecanismos de nucleación y/o polimerización (Kuijpers and Hoogenraad 2011). Sin embargo, otros estudios han mostrado que, en el mecanismo de diferenciación neuronal, el centrosoma pierde su función como principal MTOC celular por lo que la nucleación debe tener lugar desde localizaciones diferentes. En este sentido, se ha descrito que esta inhibición de la actividad del centrosoma es consecuencia de la pérdida de NEDD1 (Stiess et al. 2010) o de la deslocalización de nineína como consecuencia de mecanismos de *splicing* alternativo (Xiaochang Zhang et al. 2016) que dan lugar a la expresión de una isoforma que no localiza en el centrosoma.

En este sentido, apoyando la idea anterior del papel esencial de AKAP450 en la nucleación de MTs desde el AG, el homólogo de AKAP450 en *Drosophila* (CP309) se ha descrito que juega un papel central en la nucleación acentrosomal de MTs en neuronas de arborización dendrítica (da) de clase IV. Estas neuronas no poseen centrosoma y por tanto constituyen un modelo estupendo para estudiar la nucleación acentrosomal (Ori-McKenney, Jan, and Jan 2012). En este tipo de neuronas altamente ramificadas, hay determinados fragmentos de Golgi, denominados '*Golgi outspots*' que se localizan en las dendritas justo en los puntos de ramificación. Los autores observaron mediante microscopía in vivo que los cometas de EB1 nacían de aproximadamente la mitad de los '*Golgi outspots*'. Además, usaron un ensayo in vitro donde los fragmentos de Golgi eran recogidos e incubados con dímeros de α - y β -tubulina en presencia de GTP. Bajo esas condiciones los MTs se formaban en los fragmentos de forma dependiente de γ -tubulina (ya que desaparecían si se preincubaban con un anticuerpo bloqueante de γ -tubulina). Por último, usaron mutantes de *Drosophila* donde CP309 o γ -tubulina fueron inactivados y aunque los '*Golgi outspots*' seguían localizándose en los puntos de ramificación, encontraron una reducción dramática en el porcentaje de cometas de EB1 que nacían de esos fragmentos de Golgi.

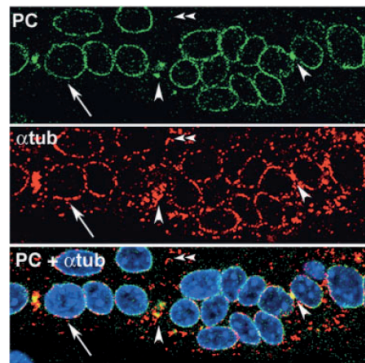
2.4. Otros MTOCs celulares

Hasta la fecha, la mayoría de estudios relacionados con la nucleación de MTs se han centrado en la función como MTOCs tanto del centrosoma como del AG. Sin embargo, la nucleación de MTs desde localizaciones distintas a estos dos principales MTOCs también desempeña un papel importante en la creación y mantenimiento de la estructura celular en diferentes estadios y tipos celulares.

2.4.1. La envuelta nuclear

En cierto tipo de células animales diferenciadas tales como las células de músculo esquelético, los extremos (-) de los MTs se organizan entorno a la envuelta nuclear (Petry and Vale 2015). Así, al perder el centrosoma como consecuencia de la diferenciación, la envuelta nuclear (además del AG (Oddoux et al. 2013)) ejerce las funciones de MTOC, siendo responsables tanto de la nucleación como del anclaje de MTs. En estas condiciones, tiene lugar una redistribución de proteínas del material pericentriolar tales como γ -tubulina, PCNT o nineína desde el centrosoma a la membrana nuclear (Bugnard, Zaal, and Ralston 2005; Fant et al. 2009; A. M. Tassin, Maro, and Bornens 1985) (Figura I21). La relocalización de estas proteínas a dicha localización, depende directamente de Nesprina-1 α , una proteína de la membrana nuclear externa que conecta el núcleo con el citoesqueleto por medio de su región N-terminal (Espigat-Georger et al. 2016; Q. Zhang et al. 2002).

A



B

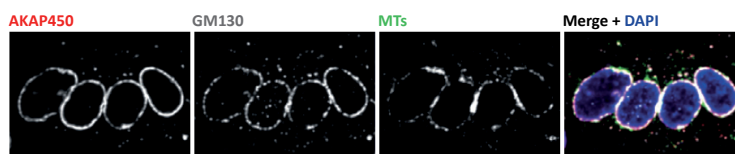


Figura I21. Nucleación de MTs desde la envuelta nuclear en células de músculo esquelético. (A) Imágenes de microscopía de mioblastos teñidos con anticuerpos anti-PCNT (PC) (verde), anti- α -tubulina (rojo) y Hoechst (azul) para ver el núcleo. Se observa como la PCNT localiza en la superficie de la envuelta nuclear y se indica la nucleación de MTs desde el centrosoma (punta de flecha individual), desde la envuelta nuclear (flechas) y desde el citoplasma (puntas de flechas dobles). **(B)** Miotubos diferenciados de células humanas marcados con anti-AKAP450 (rojo), anti-GM130 (gris), anti- α -tubulina y DAPI (núcleo, azul). Se muestra como al igual que PCNT, tanto AKAP450 como GM130 localizan en torno a la membrana nuclear y colocalizan con los MTs que están siendo nucleados desde esa superficie. Modificada de (Bugnard, Zaal, and Ralston 2005; Y. L. Lee et al. 2017).

Las nesprinas se hallan también implicadas en el reclutamiento de quinesina a la envuelta nuclear, y desempeñan un papel esencial en el posicionamiento del núcleo en las células de músculo esquelético (Chapman et al. 2014; Stroud et al. 2017; Wilson and Holzbaaur 2015), aunque aún no se ha descrito

cómo la nucleación de MTs desde esta localización afecta a dicho posicionamiento. Estudios recientes llevados a cabo por Gimpel y colaboradores (Gimpel et al. 2017) muestran que Nesprina-1 α , además de interactuar con Pericentrina, va a reclutar a AKAP450 mediante un mecanismo independiente de quinesinas y que solo AKAP450, pero no otras proteínas centrosómicas, es necesaria para la nucleación de MTs desde la envuelta nuclear. Así, si tenemos en cuenta el papel esencial de AKAP450 en la nucleación de MTs desde el AG y dado que este tipo de nucleación también tiene lugar en células musculares, estos resultados parecen indicar que existe una clara cooperación entre ambas estructuras (la envuelta nuclear y el AG) para organizar todo el citoesqueleto celular.

2.4.2. La cromatina y los cinetocoros

Durante mitosis, la nucleación de MTs se ve altamente favorecida en torno a la cromatina, lo que estimula la formación de un gradiente de Ran-GTP (*Ras-related nuclear protein*) que en definitiva favorece la activación de varios factores implicados en la formación del huso mitótico tales como TPX2 (Clarke and Zhang 2008). Además, de forma adicional, el complejo pasajero del cromosoma (CPC), que consiste en la quinasa Aurora B asociada a distintas proteínas de andamiaje, también favorece la formación de MTs desde la cromatina (Clarke and Zhang 2008). Diversos estudios han descrito que componentes de los poros nucleares son capaces de unirse a la cromatina o a los cinetocoros y gracias a la interacción con γ TuRCs actuar como “semillas” para la formación de nuevos MTs (Mishra et al. 2010; Yokoyama et al. 2014). Sin embargo, también existen otros trabajos que sugieren la posibilidad de que un pool difuso de γ -tubulina pueda concentrarse en torno a los cromosomas promoviendo la nucleación o estabilización de MTs. Independientemente, parece claro que esa nucleación de MTs desde la cromatina es dependiente de la fosforilación de NEDD1 por Aurora A, la cual es a su vez activada por TPX2 (Lüders, Patel, and Stearns 2006; Pinyol, Scrofani, and Vernos 2013; Scrofani et al. 2015) (Figura I22). TPX2 también va a formar complejos con γ TuRCs y RHAMM (Groen et al. 2004) (*microtubule-associated protein receptor for hyaluronan-mediated motility*) de forma que los complejos TPX2-Aurora A se asocian con otros complejos proteicos específicos que contienen RHAMM-NEDD1- γ TuRC constituyendo los cofactores esenciales para la nucleación de MTs dependiente de cromatina (Pinyol, Scrofani, and Vernos 2013; Scrofani et al. 2015) (Figura I14). De forma adicional, para favorecer una nucleación más rápida y eficiente, TPX2 es capaz de cooperar con otro tipo de proteínas tales como la polimerasa de MTs XMAP215 (chTOG en células humanas) (Roostalu, Cade, and Surrey 2015).

En este sentido, numerosos estudios se han llevado a cabo sobre el papel de otro tipo de MAPs en mitosis. Sin embargo, la mayoría de ellos se centran en el análisis de los mecanismos implicados en

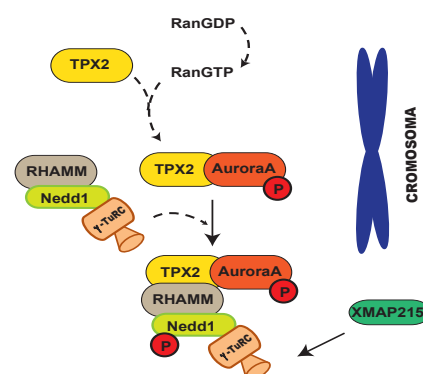


Figura I22. Representación esquemática de la nucleación de MTs desde la cromatina y los cinetocoros. Esquema de los mecanismos y proteínas implicadas en la nucleación de MTs asociada a la cromatina y los cinetocoros. Modificada de (Sulimenko et al. 2017)

la regulación dinámica y estabilización del anclaje de MTs del huso mitótico a los cinetocoros, proceso necesario para garantizar la correcta segregación de los cromosomas, pero que no implica mecanismos de nucleación propiamente dicho (Amin, Agarwal, and Varma 2019).

2.4.3. La superficie de otros microtúbulos pre-existentes

Otro posible mecanismo de nucleación de MTs no centrosomal es la formación de nuevos MTs desde la superficie lateral de MTs pre-existentes (Sulimenko et al. 2017). El elemento esencial en este mecanismo de ramificación dependiente de γ -tubulina es el complejo de augmina, formado por un hetero-octámero de proteínas. La augmina es capaz de reclutar NEDD1 y éste a su vez se asocia con los γ TuRCs favoreciendo la nucleación desde MTs ya existentes (Goshima et al. 2008) (Figura I23). Este mecanismo resulta esencial en la nucleación de nuevos MTs desde los MTs del huso mitótico y permite

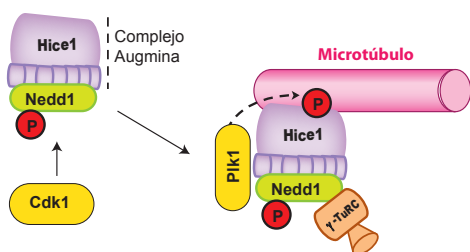


Figura I23. Representación esquemática de la nucleación de MTs desde la superficie de MTs pre-existentes. Esquema de los mecanismos y proteínas implicadas en la formación de nuevos MTs desde la superficie lateral de MTs pre-existentes. Modificada de (Sulimenko et al. 2017)

el control de la densidad de éste (Goshima et al. 2008). En células humanas, la augmina, que se encuentra altamente conservada en la evolución, está compuesta por ocho subunidades denominadas HAUS (*homologous to augmin subunits*) (Uehara et al. 2009). La reconstrucción *in vitro* de la augmina humana reveló que se trata de un complejo en forma de Y capaz de adoptar múltiples conformaciones. La subunidad de augmina HAUS8 o Hice1 es la responsable directa de la unión del complejo a los MTs (Hsia et al. 2014) (Figura I23). Esta interacción depende de la fosforilación de Hice1 por PLK1, que a su

vez dependerá de la interacción PLK1-NEDD1 inducida por la fosforilación de NEDD1 por parte de CDK1 (Johmura et al. 2011) (Figura I15). Así, estudios recientes han demostrado que en neuronas del hipocampo de ratón algunos MTs son nucleados a partir de γ TuRCs anclados a la superficie de MTs pre-existentes vía augmina, reforzando la idea de la importancia de la nucleación acentrosomal en la polaridad de los MTs (Sánchez-Huertas et al. 2016).

2.4.4. Sitios asociados a la membrana plasmática

En las células epiteliales, algunas proteínas del PCM pierden su asociación con el centrosoma y pueden redistribuirse a la superficie del córtex celular de modo que sitios específicos en la membrana plasmática pueden funcionalmente reemplazar el papel del centrosoma como MTOC (Dyachuk, Bierkamp, and Merdes 2016). Así, estas células a menudo presentan redes de MTs acentrosomales organizados de manera paralela y longitudinalmente con los extremos (-) anclados a la superficie celular de la región apical y los extremos (+) orientados hacia la región basal (Sanchez and Feldman 2017). Esta organización de MTs resulta esencial para el mantenimiento de la polaridad celular ya

que el transporte asimétrico dirigido (hacia un extremo u otro) asegura la distribución asimétrica de componentes estructurales e implicados en mecanismos de señalización.

En algunos tipos de células polarizadas tales como los queratinocitos, la proteína de anclaje de MTs nineína desempeña un papel importante en la organización de los MTs localizándose en las interacciones célula a célula vía desmoplaquina (proteína de la placa de unión de los desmosomas) (Lechler and Fuchs 2007), mientras que en las células intestinales aparece asociada a la corteza apical (Mogensen et al. 2017). El mantenimiento de estas redes de MTs parece estar sostenido por la presencia de proteínas de unión a extremos (-) (-TIPs) tales como las CAMSAPs 1-3 en mamíferos o la patronina en invertebrados (Akhmanova and Steinmetz 2015). Así, en dichas células intestinales, la pérdida de CAMSAP3 genera una grave desorganización de los haces apico-basales de MTs (Toya et al. 2016).

Trabajos similares han descrito que la proteína de unión a extremos (+) CLASP2 se localiza en las uniones adherentes de queratinocitos de ratón vía interacción con p120-catenina y que permite la focalización de los haces de MTs hacia dichas localizaciones favoreciendo el correcto mantenimiento y estabilidad de estas interacciones célula-célula (Shahbazi et al. 2013). En esta misma línea, la proteína centrosómica CAP350 también ha sido descrita como un adaptador funcional entre las uniones adherentes y los haces de MTs (Gavilan et al. 2015). Estos estudios mostraban que la proteína se localiza específicamente en las uniones adherentes de las células epiteliales vía interacción con α -catenina, donde favorece el establecimiento de haces de MTs apico-basales esenciales para la regulación de la diferenciación epitelial y el mantenimiento de la estructura celular.

III. PRINCIPALES RECLUTADORES DE γ TuRCs

3.1. AKAP450

Las proteínas AKAPs (*Protein kinase A-anchoring proteins*) se caracterizan por su capacidad para interaccionar con la quinasa A (PKA; *protein kinase A*), específicamente con su subunidad reguladora (RI o RII) y, por tanto, modular la señalización celular mediada por AMPc (Colledge and Scott 1999). A efectos de nucleación de MTs, el miembro más importante es AKAP450, también conocido como AKAP9, AKAP350 o CG-NAP. AKAP450 fue descrita por primera vez en la línea linfoblástica KE37 por su capacidad de unión a la subunidad RII de la PKA (Keryer et al. 1993) y hace referencia a un grupo de isoformas generadas por eventos de *splicing* de su región C-terminal habiéndose detectado hasta seis isoformas diferentes. AKAP450 funciona como una plataforma de señalización capaz de integrar múltiples vías de señalización pues, además de con la quinasa A, interacciona con las quinasas N (PKN) y C (PKC), así como con diferentes fosfatasas y fosfodiesterasas (Takahashi et al. 1999). La variante más corta, denominada Yotiao, se localiza principalmente en neuronas (Witczak 1999) y cardiomiocitos (Diviani et al. 2011), mientras que las variantes de mayor tamaño están presentes en el centrosoma y AG de células del resto de tejidos (Takahashi et al. 1999) donde intervienen en diferentes mecanismos.

3.1.1. Características y funciones de AKAP450

AKAP450 es una proteína de gran tamaño, con 3908 aminoácidos (la variante más larga) y aproximadamente 450 kDa de peso molecular, que posee numerosos dominios de tipo *coiled-coil* y que como ya hemos indicado anteriormente, se localiza en los dos principales MTOCs celulares (Schmidt et al. 1999; Takahashi et al. 1999; Witczak 1999) y en el citoplasma. AKAP450 fue una de las primeras proteínas con capacidad para interactuar con complejos de nucleación por medio de su interacción con las subunidades GCP2 y GCP3 (Takahashi et al. 2002). Ya hemos mencionado que la nucleación de MTs desde el AG depende estrictamente del reclutamiento de AKAP450 por la proteína de *cis*-Golgi GM130 (Rivero et al. 2009; Wu et al. 2016) y un trabajo describió que el mecanismo de reclutamiento de γ TuRCs recae sobre la región más N-terminal de la proteína vía interacción con GCP2 y GCP3 (Takahashi et al. 2002), aunque éste último dato ha sido cuestionado con posterioridad (Hurtado et al. 2011).

En cambio, en el caso del centrosoma aún no está completamente clara su mayor o menor relevancia en dicho proceso. Se ha descrito que la reducción de la proteína vía siRNA provoca un cierto retraso en el crecimiento de los MTs en ensayos de repolimerización tras tratamiento con NZ (Cecilia Larocca, Jin, and Goldenring 2006). Además, la eliminación de AKAP450 afecta al establecimiento de una adecuada organización intracelular en torno al eje núcleo-centrosoma-AG provocando claros defectos en la migración celular (Hurtado et al. 2011; Tonucci et al. 2015).

Un par de trabajos han descrito también un posible papel de AKAP450 en la duplicación del centrosoma y del ciclo celular. Su eliminación (Mattaloni et al. 2013) o el desplazamiento de la proteína endógena del centrosoma por medio de la expresión de algún truncado (Keryer et al. 2003), impiden la duplicación del centrosoma e inhiben la transición G1/S. La duplicación del centrosoma se vería afectada debido a la interacción de AKAP450 con el complejo ciclina E-cdk2 (Cdk2), mientras que la no progresión a lo largo del ciclo se atribuye a la activación de Cdc42, proteína implicada en el control del avance a lo largo del ciclo celular (Keryer et al. 2003; Mattaloni et al. 2013). Sin embargo, estos resultados no se han vuelto a confirmar y requieren de estudios adicionales.

En este sentido, la propia localización de la proteína dentro de la estructura del centrosoma podría estar desempeñando un papel esencial. Como ya hemos indicado, AKAP450 y pericentrina comparten un dominio C-terminal de interacción con el centrosoma (*PACT domain*). Una reciente publicación analiza la localización de AKAP450 mediante microscopía de superresolución (Kolobova et al. 2017). Se ha detectado que, a diferencia de la localización radial de pericentrina, AKAP450 podría localizarse en el *linker* intercentriolar, mostrando una interacción con la proteína CEP68, componente esencial de este *linker* y necesario para garantizar la correcta cohesión de los centriolos. Aunque los datos obtenidos pueden ser dependientes del anticuerpo y la línea celular empleados (anti-AKAP450, clon 14G2 y células HeLa en este caso), apuntan a la posibilidad de que AKAP450 pueda estar regulando el vínculo entre centriolos y por tanto desempeñar funciones que complementen el papel de pericentrina en esta estructura (Kolobova et al. 2017). Sin embargo, son resultados que requieren confirmación adicional.

Por último, se ha descrito que la expresión de la región más C-terminal de AKAP450 (fragmento que

incluye desde el aa 2691 al 3907) induce la formación citoplásmica de lo que los autores denominan centros nucleadores de MTs (MTNCs: *microtubule nucleation centers*), capaces de nuclear MTs y reclutar entre otros componentes γ -tubulina, CDK5Rap2 y pericentrina (Kolobova et al. 2017). Sin embargo, a pesar de que la proteína (al menos su región C-terminal) presenta capacidad para reclutar estas proteínas e iniciar la formación de estos MTNCs, así como otorgarles capacidad de nucleación, la eliminación de AKAP450 endógena no afecta al pool centrosómico de proteínas del PCM tales como CDK5Rap2 o γ -tubulina por lo que el papel de la proteína en el centrosoma y su relevancia en la estabilidad y localización de otras proteínas está aún lejos de ser aclarado.

Así, los datos disponibles sobre la función de AKAP450, aunque lejos de ser precisos aún, parecen apoyar el papel de AKAP450 como una proteína de andamiaje para otras proteínas implicadas en la regulación del mecanismo de nucleación de MTs.

3.2. Pericentrina

Como mencionábamos anteriormente, la pericentrina (PCNT) es el parólogo de AKAP450. Se trata, igualmente de una proteína de gran tamaño con abundantes dominios *coiled-coil* altamente conservada en la evolución. Existen dos isoformas diferentes originadas mediante mecanismos de *splicing* alternativo, siendo la variante de mayor longitud de 3336 aa y con un peso molecular de aproximadamente 380 kDa (Mühlhans and Gießl 2012). Posee como ya hemos indicado un dominio específico de interacción con el centrosoma conocido como *PACT domain* (Gillingham and Munro 2000) y desempeña un papel esencial en la biogénesis del centrosoma (Ito et al. 2019), en el mantenimiento de la integridad del PCM (Lerit et al. 2015; Richens et al. 2015) y en el establecimiento del huso mitótico (J. Kim, Kim, and Rhee 2019; Zimmerman et al. 2004).

3.2.1. Características y funciones de pericentrina

La PCNT actúa a modo de andamio para el reclutamiento y anclaje de una gran variedad de proteínas del PCM incluyendo CDK5Rap2, NEDD1 o los propios γ TuRCs, por lo que desempeña un papel importante en los mecanismos de nucleación de MTs y en la organización del huso mitótico (Lawo et al. 2012). En el caso de células humanas, la implicación de PCNT en la nucleación de MTs requiere del reclutamiento de la proteína al PCM, donde desempeña funciones estructurales y actúa como factor reclutador de complejos de γ -tubulina. Este mecanismo de reclutamiento es dependiente de un transporte activo mediado por dineína y resulta esencial para la funcionalidad del centrosoma como MTOC (Young et al. 2000). Ensayos de siRNA de la proteína han demostrado que la ausencia de ésta inhibe la nucleación de MTs desde los centrosomas mitóticos debido a la deslocalización de γ -tubulina de los polos, fenotipo que parece ser exclusivo de esta fase del ciclo ya que la red de MTs en interfase resulta intacta bajo estas condiciones (Doxsey et al. 1994; Zimmerman et al. 2004).

La correcta orientación del huso mitótico depende de la interacción de los MTs astrales con el córtex celular y a su vez, la actividad nucleadora de MTs del centrosoma mitótico es indispensable para la formación de estos MTs astrales. Se ha observado que fibroblastos de ratones knock-out (*pcnt*^{-/-})

presentan una significativa ausencia de MTs astrales y, en consecuencia, una alta proporción de husos desorientados (Chen et al. 2014).

La PCNT también parece estar implicada en mecanismos asociados a la progresión del ciclo celular, la regulación de los *checkpoints*, o el control de la entrada en mitosis. En este sentido, hay estudios que describieron que la PCNT podría estar implicada en el anclaje al centrosoma de Chk1 (*checkpoint kinase 1*), una quinasa responsable del control del mecanismo de entrada en mitosis. Así, la eliminación de la proteína impide dicho reclutamiento provocando la entrada prematura en mitosis e induciendo incluso la muerte celular (Griffith et al. 2008; Tibelius et al. 2009). Sin embargo, estos resultados específicos parecen más asociados a cierto tipo de patologías concretas como el enanismo (del que hablaremos más adelante). Por último, lo que sí parece claro, es el papel de pericentrina en la separación de los centriolos durante anafase, mecanismo esencial para otorgar al centrosoma la capacidad de iniciar un nuevo ciclo de duplicación de centriolos tras la salida de mitosis. Así, se ha descrito que la rotura de PCNT por parte de la proteína separasa, proteasa implicada en la separación de las cromátidas hermanas, es esencial para la separación de los centriolos en anafase (K. Lee and Rhee 2012; Matsuo et al. 2012); y que dicho procedimiento es dependiente de la fosforilación previa de PCNT por parte de PLK1 (J. Kim, Lee, and Rhee 2015).

A diferencia de lo observado en el caso de AKAP450 y CDK5Rap2, los anticuerpos anti-PCNT no revelan un marcaje claro en el AG a excepción de su presencia en el AG de las fibras de músculo esquelético (Oddoux et al. 2013). Dada la capacidad de la PCNT para interactuar con CDK5Rap2 (Buchman et al. 2010) y puesto que este último es reclutado al AG vía AKAP450, parece lógico pensar que PCNT también pudiera localizarse en el AG desempeñando funciones asociadas a la nucleación de MTs. Sin embargo, no existen datos en la bibliografía que apoyen algún tipo de contribución en este sentido, por lo que son necesarios estudios adicionales que permitan dilucidar el papel de PCNT en el AG y que vayan más allá de la idea del simple reclutamiento de la proteína asociada a su interacción con AKAP450 y CDK5Rap2.

3.3. CDK5RAP2

CDK5Rap2 (*Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit-associated protein 2*) pertenece a la familia de proteínas de la centrosomina, que constituyen un grupo de proteínas muy conservado en eucariotas, aunque no se encuentran presentes en plantas. La centrosomina (CNN) fue descubierta en *Drosophila melanogaster*. Estas proteínas se caracterizan por tener amplios dominios *coiled-coil* así como dos dominios altamente conservados, los motivos de centrosomina 1 y 2 (CM1 y CM2 respectivamente) (Megraw, Sharkey, and Nowakowski 2011). La proteína humana CDK5Rap2 presenta hasta cuatro isoformas generadas mediante procesos de *splicing* alternativo. Ninguno de los considerados como dominios funcionales se sitúan en los exones susceptibles de experimentar dicho *splicing*, por lo que la función específica de estas isoformas es aún una cuestión sin resolver (Kraemer et al. 2011). La isoforma humana de mayor tamaño presenta 1893 aa y posee ciertos dominios característicos: a) una región N-terminal de interacción con el γ TuRC (Fong et al. 2008), b) dos sitios

implicados en el mantenimiento de la estructura de los cromosomas (SMC) (P. D. Evans, Vallender, and Lahn 2006; Hirano 2005; Revenkova et al. 2001), c) un dominio rico en serina de interacción con la proteína de extremos (+) EB1 (Fong et al. 2009), d) un sitio de interacción con pericentrina (Wang et al. 2010), e) un dominio C-terminal del tipo CM2 de interacción con el AG (Wang et al. 2010) y f) un sitio de interacción con CDK5R1, un modulador de la actividad de la ciclina dependiente de quinasa 5 (CDK5) (Ching, Qi, and Wang 2000).

3.3.1. Características y funciones de CDK5Rap2

Como ya hemos indicado, CDK5Rap2 es un componente estructural del PCM del centrosoma que participa en el reclutamiento de γ TuRC al mismo y por tanto en los mecanismos de nucleación y organización de MTs desde dicho MTOC (Fong et al. 2008). CDK5Rap2 se sitúa a lo largo del PCM en todos los estadios del ciclo celular, aunque sus niveles en el centrosoma presentan una regulación dependiente de ciclo, asociado principalmente al mecanismo de maduración de éste (Barrera et al. 2010).

De hecho, se ha descrito que la proteína está implicada en la regulación del transporte de proteínas al PCM durante el proceso de maduración del centrosoma, un proceso que es dependiente de dineína (S. Lee and Rhee 2010). La dineína se desplaza a lo largo de los MTs en dirección a los extremos (-) de éstos, que por lo general se suelen encontrar anclados a la superficie de los MTOCs. Estudios de eliminación de CDK5Rap2 han mostrado que la ausencia de la proteína provoca una reducción de la presencia de dineína entorno al centrosoma, pero no afecta los niveles totales de la proteína ni la cantidad de ésta que interacciona con los MTs, lo que los llevó a concluir que CDK5Rap2 podría ser la encargada de regular el transporte dependiente de dineína de las proteínas del PCM durante el proceso de maduración del centrosoma (S. Lee and Rhee 2010).

Otros trabajos previos habían identificado a CDK5Rap2 como esencial para la formación del huso mitótico y la correcta orientación de éste (Bond et al. 2005), así como la adecuada segregación de cromosomas durante mitosis pues interviene en la vía de señalización del *checkpoint* asociado a la correcta formación del huso mitótico (Xiaoying Zhang et al. 2009). En este sentido se ha observado que la inhibición de CDK5Rap2 provoca una menor expresión de las proteínas implicadas en el *checkpoint* del huso tales como BUBR1 y MAD2 (Xiaoying Zhang et al. 2009).

También se ha descrito que CDK5Rap2 es necesario para el mantenimiento de la cohesión centriolar controlando así el mecanismo de replicación del centrosoma (Xiaoying Zhang et al. 2009) y defectos en la orientación del huso mitótico relacionados con la falta de CDK5Rap2 parecen estar asociados a la disminución de capacidad de nucleación del centrosoma (Hanafusa et al. 2015)

Además de con PCNT, CDK5Rap2 es capaz de interaccionar también con AKAP450. La interacción con PCNT es necesaria para la localización centrosómica de la proteína, mientras que la unión a AKAP450 permite la localización al AG (Wang et al. 2010). Así, mientras que la función de CDK5Rap2 en el centrosoma parece clara y está asociada especialmente a los mecanismos de nucleación de MTs, principalmente en mitosis, el papel de la proteína en el AG no está completamente definido. Su

eliminación no afecta significativamente la nucleación de MTs desde el AG (Wu et al. 2016) como es el caso de AKAP450 (Rivero et al. 2009) por lo que su papel en esta estructura es una cuestión aún sin resolver.

3.4. MIOMEGALINA

Como se indicó previamente, Miomegalina es el parólogo de CDK5Rap2. Se trata igualmente de una larga proteína que contiene 2324 aa (la isoforma de mayor tamaño) principalmente formada por estructuras y dominios de α -hélice y *coiled-coil* junto con motivos de centrosomina. Inicialmente, se describió como una proteína presente tanto en el centrosoma como en el AG capaz de interactuar con PDE4D (*Cyclic nucleotid phosphodiesterase*, una enzima implicada en la regulación de los niveles de AMPc) y que se encuentra altamente expresada en tejido muscular (Verde et al. 2001).

Estudios posteriores llevados a cabo por Roubin y colaboradores (Roubin et al. 2013) mostraron que, en células RPE-1, la proteína existía en forma de varias isoformas (8 en su caso) como resultado de mecanismos de *splicing alternativo*. Siete de estas isoformas, presentaban un dominio conservado de tipo CM1 en la región N-terminal y las tres isoformas de mayor longitud incluían de forma adicional otro motivo de tipo CM2 en la región C-terminal (dominio caracterizado en CDK5Rap2 como el responsable de su reclutamiento tanto al centrosoma como al AG (Wang et al. 2010)). Finalmente caracterizaron dos de esas isoformas, a las que denominaron: CM-MMG y EB-MMG.

La isoforma CM-MMG contiene un motivo CM1 y localiza tanto en el centrosoma como en la cara *cis* del Golgi de forma dependiente de AKAP450. Presenta además capacidad para reclutar complejos γ TuRCs y promueve la nucleación de MTs. Por su parte, la isoforma EB-MMG carece de dominio CM1 y posee un único motivo N-terminal capaz de interactuar con EB1. En este caso, los resultados mostraban que dicha isoforma sólo se hallaba presente en la cara *cis*-del AG. Los autores concluyen que existen diferentes isoformas de miomegalina con funciones diferentes que permiten la regulación del proceso de nucleación de MTs en distintas localizaciones subcelulares.

En 2014, el grupo de Robert Qi (Wang, Zhang, and Qi 2014), identificó a partir de extractos de ARN total de células HeLa una nueva isoforma a la que denominaron MMG8 (isoforma 8) y en la que se han centrado la mayoría de estudios posteriores.

3.4.1. Características y funciones de Miomegalina (MMG8)

En dicho estudio (Wang, Zhang, and Qi 2014), los autores describen que la isoforma MMG8 es una proteína ampliamente expresada que se localiza en la cara *cis* del AG mediante la interacción con AKAP450. De acuerdo con sus resultados, la estabilidad de ambas proteínas es interdependiente, indicando que la ausencia de una de ellas provoca la degradación de la otra vía proteasoma. Además muestran como en el AG, MMG8 interviene en el reclutamiento de complejos γ TuRCs, indicando que el silenciamiento de la proteína afecta notablemente a la nucleación de MTs, efecto que no se observó en el caso del centrosoma. Igualmente describieron que MMG8 es capaz de interactuar con EB1 permitiendo la captura de los extremos (+) de los MTs y facilitando el eficiente transporte RE-Golgi

dependiente de MTs.

En esta misma línea, estudios posteriores (Yang et al. 2017) también describieron la capacidad de MMG8 de reclutar EB3 además de EB1 a la superficie del AG (interacción que tendría lugar vía los dominios C-terminal de estas proteínas EBs) y que este proceso estaría implicado en el reclutamiento de microtúbulos asociados a CAMSAP2 al AG (tal y como indicamos anteriormente).

Por último, en referencia al papel de la proteína en el centrosoma, en un estudio reciente (Bouguenina et al. 2017) describen que esta isoforma MMG8 va a contribuir a la nucleación de MTs desde el centrosoma también mediante un mecanismo dependiente de AKAP450 e EB1. Del mismo modo, indican que la inhibición de la expresión de la proteína afecta a la formación de MTs astrales y en consecuencia altera la correcta orientación del huso mitótico. En este sentido, cabe mencionar que parte de estos resultados se obtuvieron a partir de ensayos de sobreexpresión de una proteína exógena, por lo que serían necesarios estudios adicionales que confirmasen dichas conclusiones.

Así, a diferencia de su homólogo CDK5Rap2, la miomegalina parece presentar un papel mucho más importante en los mecanismos de nucleación desde el AG, mientras que su influencia en las funciones del centrosoma como MTOC no se encuentra analizada en detalle y requiere de estudios adicionales. Sin embargo, el elevado número de isoformas existentes y la poca caracterización de las mismas, dificultan notablemente cualquier avance significativo en este sentido.

3.5. CEP192

CEP192 es una proteína del PCM originalmente descrita en la línea linfoblástica KE37 (Andersen et al. 2003) y que esta conservada en organismos superiores (SPD-2 en gusanos y moscas). Existen cuatro isoformas de CEP192 de las cuales la isoforma predominante en humanos es una proteína de aproximadamente 280 kDa. Se caracteriza por presentar una región N-terminal en la que se halla un dominio de en torno a 1000 aa capaz de interaccionar con Aurora A, γ TuRCs o XMAP215 entre otros complejos y que promueve el ensamblaje de MTs (Joukov, Walter, and De Nicolo 2014).

3.5.1. Características y funciones de CEP192

Se ha descrito que CEP192 desempeña funciones esenciales para el correcto funcionamiento del centrosoma, duplicación de centriolos y la formación del huso mitótico (Gomez-Ferreria et al. 2007; K. F. Sonnen et al. 2013; F. Zhu et al. 2008). En este sentido, dos estudios independientes han mostrado que la eliminación de la proteína afecta considerablemente a la capacidad de maduración del centrosoma previa a mitosis así como perturba la correcta orientación del huso (Gomez-Ferreria et al. 2007; F. Zhu et al. 2008). Así, la proteína parece situarse en la base de la maquinaria implicada en la maduración del centrosoma, ya que también se ha descrito que su eliminación impide el reclutamiento de numerosas proteínas reguladoras de los mecanismos y funciones de éste en mitosis e implicadas en el proceso de duplicación del centriolo (Gomez-Ferreria et al. 2007; K. F. Sonnen et al. 2013; F. Zhu et al. 2008).

Con respecto a la nucleación de MTs, CEP192 parece jugar un papel similar al desempeñado por PCNT. Sin embargo, la pérdida de CEP192, no sólo impide el reclutamiento de γ -tubulina al centrosoma

sino que provoca también el desplazamiento de la propia PCNT de los centrosomas mitóticos (pero no durante interfase) (Gomez-Ferreria et al. 2007; Zimmerman et al. 2004). Otros trabajos también se han centrado en el papel de CEP192 en la formación y establecimiento del huso mitótico. Así, se ha observado que la eliminación de la proteína provoca fallos significativos en la orientación del huso ya que la disponibilidad de MTs en estas condiciones desde diferentes localizaciones (centrosomas, cromosomas...) se ve claramente afectada (Gomez-Ferreria et al. 2007, 2012). Todos estos datos parecen apoyar la idea del papel de CEP192 como andamio durante la maduración del centrosoma para aumentar la estabilidad de complejos proteicos necesarios para la correcta y eficiente formación de MTs.

Por último, estudios más recientes han demostrado que el papel de CEP192 en la formación y función del centrosoma no solo se limita a mitosis, sino que es igualmente esencial durante interfase. Así, la eliminación de la proteína en células en interfase provoca una reducción significativa de la nucleación de MTs desde el centrosoma pero a su vez, potencia este mecanismo desde otras localizaciones celulares tales como el AG (O'Rourke et al. 2014). Dato que de nuevo apoyaría la idea de la existencia de algún tipo de conexión entre los distintos MTOCs celulares.

IV. ENFERMEDADES HUMANAS Y DIANAS TERAPÉUTICAS

Como ya hemos indicado, el citoesqueleto microtubular presenta funciones esenciales que van desde el mantenimiento de la morfología celular al control del transporte intracelular, la señalización, el establecimiento de la polaridad, la migración y la división celular. A este respecto, la estabilidad y funcionabilidad de los principales MTOCs celulares es esencial para el correcto establecimiento de la red de MTs.

Como uno de los órganos estructuralmente más complejos de nuestro organismo, el cerebro es especialmente sensible a disfunciones del centrosoma (Nano and Basto 2017). Es quizás por ello que la mayoría de las enfermedades y patologías asociadas a dichas alteraciones son enfermedades neuronales, aunque se desconoce aún la razón molecular que las provoca.

La microcefalia primaria autosómica recesiva (MCPH) es un trastorno del desarrollo causado por una reducida proliferación neuronal durante el desarrollo embrionario y que se caracteriza por la presencia de un tamaño de cerebro inferior a la media, así como cierto grado de retraso mental (Nigg and Holland 2018). Las principales causas genéticas de esta MCPH son mutaciones en diferentes genes que expresan proteínas asociadas al centrosoma o con alguna función en él, lo que sugiere que defectos en el proceso de biogénesis de los centriolos y la función de éstos como MTOCs son las causas de los defectos neurológicos en la MCPH (Jayaraman, Bae, and Walsh 2018). Los ratones que presentan mutaciones en PLK4 y CPAP exhiben defectos en la formación del centriolo y presentan degradación de proteínas requeridas para la duplicación del mismo, dando lugar a un tamaño de cerebro reducido (Cottee et al. 2013; Martin et al. 2014). Por otro lado, mutaciones en la proteína STIL, promueven la amplificación del centriolo así como la sobreexpresión de PLK4, lo que finalmente origina ratones con

cerebros de tamaño inferior a lo normal (Arquint and Nigg 2014; Marthiens et al. 2013), demostrando que tanto un número elevado como reducido de centriolos afectará a la estabilidad celular provocando la aparición de MCPH.

La formación de un centrosoma mitótico funcional requiere la correcta expansión del PCM durante el mecanismo de maduración. Como ya hemos descrito, CDK5Rap2, es una proteína pericentriolar implicada en este proceso y su pérdida o mutación origina la pérdida de progenitores neuronales debido a su salida del ciclo celular y la diferenciación prematura de estos, lo que se traduce igualmente en un tipo de MCPH (Buchman et al. 2010; Nano and Basto 2017). Las mutaciones en CDK5Rap2 fueron inicialmente identificadas en dos familias con microcefalia y corresponden tanto a regiones codificantes como no codificantes del gen, que dan lugar a sustituciones de aminoácidos o a la generación de proteínas truncadas respectivamente (Bond et al. 2005). Estas alteraciones afectan a la orientación del huso mitótico (Lancaster et al. 2013), a la maduración del centrosoma (Conduit et al. 2014), así como a la ramificación de las dendritas (Yalgin et al. 2015) lo que contribuye al desarrollo de la MCPH por diferentes medios.

Mutaciones en la proteína PCNT causan un síndrome diferente, el Enanismo Primordial Osteodisplásico Microcefálico Tipo II, MOPDII (*Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II*) (Piane et al. 2009). La ausencia de PCNT causa defectos en la orientación y organización del huso mitótico (Purohit et al. 1999) como consecuencia de la deslocalización de γ -tubulina, afectando a la nucleación de MTs (Zimmerman et al. 2004) (especialmente los MTs astrales) y provocando la segregación aberrante de cromosomas (Baala et al. 2007).

Además de las patologías neurológicas, alteraciones en la dinámica de los MTs se han ligado también al desarrollo de cáncer. Cualquier desregulación de la dinámica de MTs puede resultar en errores en la segregación de cromosomas durante la división celular, generando lo que se conoce como inestabilidad cromosómica o CIN (*Chromosome instability*) (Albert 2015). La inestabilidad cromosómica hace referencia tanto a cambios en la estructura de un cromosoma (deleciones, duplicaciones, translocaciones...) como a la ganancia o pérdida de uno o más cromosomas completos, siendo su principal causa los defectos en la unión de MTs a los cinetocoros (Bakhoum et al. 2009; Ertych et al. 2014). Así, la proteína chTOG (homólogo de XMAP215), aparece sobreexpresada en ciertos tumores lo que confiere mayor estabilidad a los MTs y favorece el desarrollo de la enfermedad (Brouhard et al. 2008; Charrasse et al. 1995; Gutiérrez-Caballero et al. 2015; Widlund et al. 2011).

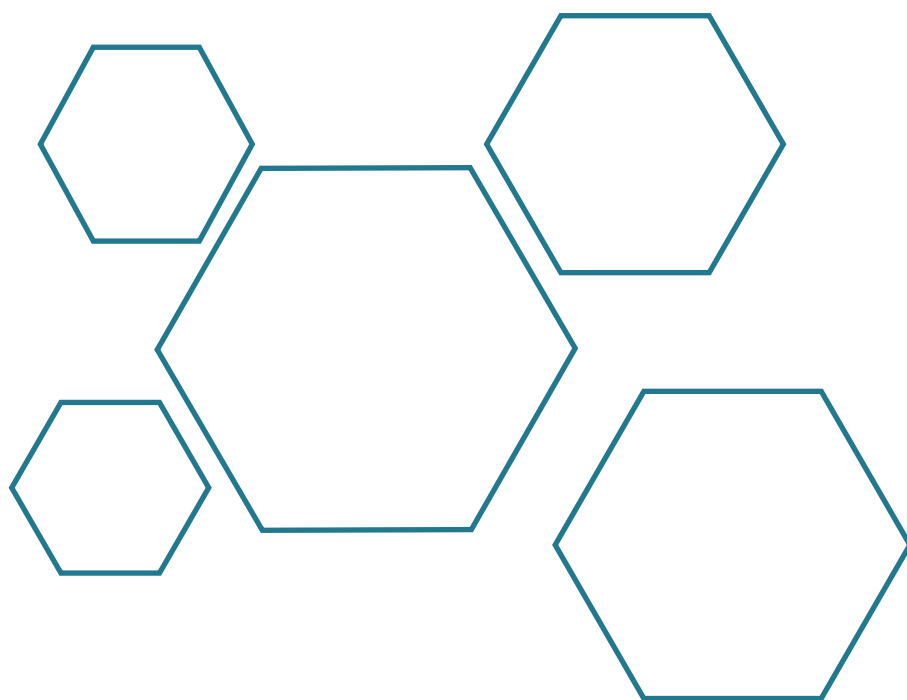
Otra de las posibles alteraciones en la dinámica de MTs asociadas al cáncer derivan de las modificaciones post-traduccionales que experimentan las propias moléculas de tubulina (Albert 2015). Cambios en estas modificaciones post-traduccionales de los MTs provocan alteraciones en la interacción de estos con las proteínas MAPs y en consecuencia afectan notablemente a su estabilidad (Janke 2014). Una de estas modificaciones, como ya hemos indicado, es la acetilación de α -tubulina, que se halla especialmente incrementada en ciertos tipos de cáncer (Giustiniani et al. 2009).

Tradicionalmente, las drogas anticancerosas más efectivas han sido las que afectan de algún modo a la dinámica de los MTs. Tales agentes conocidos como MTAs (*microtubule-targeting agents*) (Akhmanova and Steinmetz 2019) reducen la dinámica de los extremos (+) y (-) (Dumontet and Jordan

2010). La mayoría de los MTAs van dirigidos a las subunidades de β -tubulina (como el paclitaxel), y por tanto, afectan de manera especial a los extremos (+). Otros compuestos en cambio, se unen por igual a las subunidades de α - y β -tubulina afectando directamente al heterodímero (ej: colchicina) (Akhmanova and Steinmetz 2019).

Así, en conclusión, cada vez parece más claro que los MTOCs celulares son estructuras multicomponentes formadas por redes dinámicas de proteínas que poseen interacciones multivalentes y con cierto grado de redundancia. Aparte del centrosoma, el resto de MTOCs no centrosómicos (a pesar de encontrarse en la mayoría de células diferenciadas *in vivo*), presentan aún un bajo grado de conocimiento tanto a nivel estructural como funcional. Así, aún se desconoce de manera detallada como la célula es capaz de activar estas localizaciones no centrosómicas como MTOCs funcionales y cuál es la contribución de éstos a funciones celulares esenciales. Además, como hemos indicado, la actividad de estos MTOCs está implicada en numerosas enfermedades humanas, por lo que el análisis y la comprensión de cómo la célula controla la organización del citoesqueleto de MTs en diferentes condiciones y estados nos proporcionará una nueva visión para mejorar el abordaje de numerosas patologías tales como el cáncer.

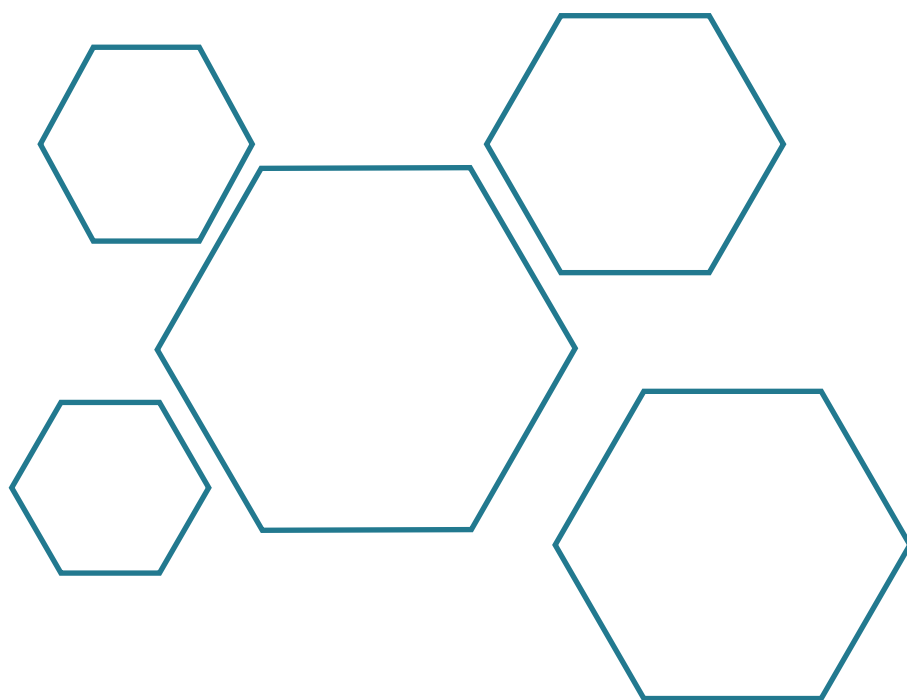
OBJETIVOS



Los objetivos de esta tesis son:

- Determinar el papel que desempeñan los principales reclutadores de γ TURCs en la nucleación de MTs desde los diferentes MTOCs celulares.
- Investigar la coordinación existente entre los distintos MTOCs, profundizando en los mecanismos moleculares responsables de tal proceso.
- Analizar como los cambios en la dinámica de nucleación de MTs desde los diferentes MTOCs repercute en la arquitectura del citoesqueleto de MTs.

RESULTADOS



**CAPÍTULO I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS
BIOLÓGICAS NECESARIAS PARA EL DESARROLLO DEL ESTUDIO.
LÍNEAS CELULARES HTERT-RPE1 KNOCK-OUT GENERADAS MEDIANTE
LA METODOLOGÍA DE CRISPR/CAS9.**

A lo largo de este primer capítulo de resultados, de carácter más técnico y descriptivo, pretendo detallar las herramientas biológicas generadas para la consecución de los objetivos propuestos. Más concretamente, se describe la generación de líneas celulares knock-out y su minuciosa caracterización necesaria para determinar la ausencia de las proteínas objeto de estudio que es clave en el análisis de los fenotipos producidos.

1.1 Generación del plásmido pIFA1 y diseño de ARNs guías

Para la generación de líneas celulares hTERT-RPE1 carentes de las proteínas AKAP450, CDK5Rap2 o pericentrina (PCNT) respectivamente así como doblemente mutadas en pericentrina/AKAP450 y pericentrina/CDK5Rap2 utilizamos la tecnología CRISPR/Cas9 nickasa. Aunque en el momento de la obtención de tales líneas ya había disponibles en la literatura diferentes procedimientos y herramientas de edición génica y teniendo en cuenta las limitaciones e inconvenientes de la misma, nos propusimos mejorar la eficiencia y especificidad del proceso mediante la construcción de un vector propio que contuviera dos sitios de clonación independientes para dos ARN guía de cadena simple (*single-guide RNAs*; sgRNAs), además de las secuencias de la Cas9n y de un gen reportero (en este caso la eGFP) al que denominamos pIFA1 (Ver Materiales y Métodos para más detalles) (Figura R1).

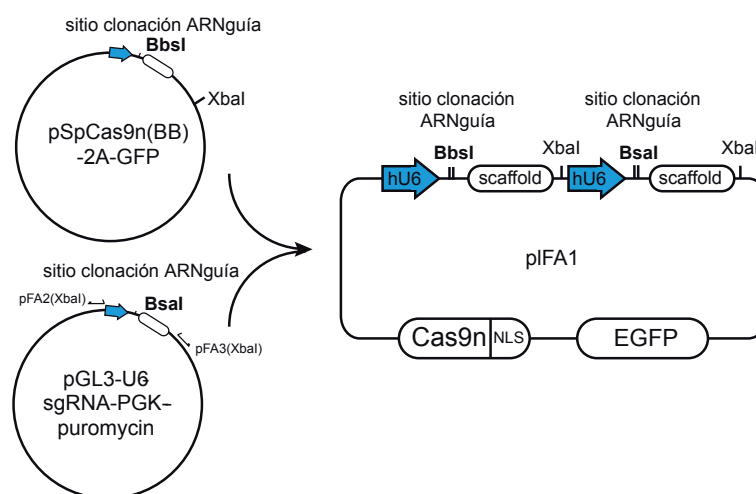


Figura R1. Generación del plásmido pIFA1 para la obtención de líneas celulares *knock-out*. Esquema de la estrategia seguida para la obtención del plásmido pIFA1. Se amplificó por PCR un fragmento del plásmido pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin que contenía el promotor hU6, sitios de clonación BsaI para la incorporación de un ARN guía y la secuencia de ARN *scaffold* necesaria para la nicasa Cas9n. Dicho fragmento se clonó en el sitio XbaI presente en pSpCas9n(BB)-2A-GFP, que a su vez contenía otro promotor hU6, sitios de clonación para otro ARN guía (en este caso usando la diana BbsI) y otra secuencia de ARN *scaffold*. Esto dio lugar al plásmido final pIFA1, con dos sitios de clonación de ARNs guías. pFA2 y pFA3 hacen referencia a los oligos empleados para amplificar dicha región por PCR (Ver Materiales y Métodos para más información).

Este plásmido sirvió de base para la generación de diferentes plásmidos específicos para cada uno de los knock-outs deseados. El siguiente paso consistió en el diseño de los ARN de cadena simple necesarios para dirigir la nucleasa (Cas9n) al locus de interés, seleccionando la región del genoma

AKAP9_HUMAN	MEDEERQKKLEAGKAK-----LAQFRQRKAQSDGQSPSKKQKKRKTSSSKHD	60
AKAP9_HUMAN	MEDEERQKKLEAGKAKIEELSLAFLVRQLAQFRQRKAQSDGQSPSKKQKKRKTSSSKHD	60
AKAP9_HUMAN	MEDEERQKKLEAGKAK-----LAQFRQRKAQSDGQSPSKKQKKRKTSSSKHD	60
AKAP9_HUMAN	MEDEERQKKLEAGKAKIEELSLAFLVRQLAQFRQRKAQSDGQSPSKKQKKRKTSSSKHD	60
AKAP9_HUMAN	MEDEERQKKLEAGKAKIEELSLAFLVRQLAQFRQRKAQSDGQSPSKKQKKRKTSSSKHD	60
AKAP9_HUMAN	*****	
AKAP9_HUMAN	VSAAHDLNIDQSQCNEMYINSSQRVSTV PESTIMRTLHSGEITSHEQ GFSVLESEIS	108
AKAP9_HUMAN	VSAAHDLNIDQSQCNEMYINSSQRVSTV PESTIMRTLHSGEITSHEQ GFSVLESEIS	120
AKAP9_HUMAN	VSAAHDLNIDQSQCNEMYINSSQRVSTV PESTIMRTLHSGEITSHEQ GFSVLESEIS	108
AKAP9_HUMAN	VSAAHDLNIDQSQCNEMYINSSQRVSTV PESTIMRTLHSGEITSHEQ GFSVLESEIS	120
AKAP9_HUMAN	VSAAHDLNIDQSQCNEMYINSSQRVSTV PESTIMRTLHSGEITSHEQ GFSVLESEIS	120
AKAP9_HUMAN	*****	
AKAP9_HUMAN	TTADDCSSEVNGCSFVMRTGKPTNLLREEEFGVDDSYSEGAQDSP THLEMMES ELAGKQ	168
AKAP9_HUMAN	TTADDCSSEVNGCSFVMRTGKPTNLLREEEFGVDDSYSEGAQDSP THLEMMES ELAGKQ	168
AKAP9_HUMAN	TTADDCSSEVNGCSFVMRTGKPTNLLREEEFGVDDSYSEGAQDSP THLEMMES ELAGKQ	168
AKAP9_HUMAN	TTADDCSSEVNGCSFVMRTGKPTNLLREEEFGVDDSYSEGAQDSP THLEMMES ELAGKQ	180
AKAP9_HUMAN	TTADDCSSEVNGCSFVMRTGKPTNLLREEEFGVDDSYSEGAQDSP THLEMMES ELAGKQ	180
AKAP9_HUMAN	TTADDCSSEVNGCSFVMRTGKPTNLLREEEFGVDDSYSEGAQDSP THLEMMES ELAGKQ	180
AKAP9_HUMAN	*****	
CK5P2_HUMAN	MMDLVLEEDVTVPG TLSGCSGLVPSVPDDLGINPAGNLGNLLPNVSEETVSP TRARM	60
CK5P2_HUMAN	MMDLVLEEDVTVPG TLSGCSGLVPSVPDDLGINPAGNLGNLLPNVSEETVSP TRARM	60
CK5P2_HUMAN	MMDLVLEEDVTVPG TLSGCSGLVPSVPDDLGINPAGNLGNLLPNVSEETVSP TRARM	60
CK5P2_HUMAN	MMDLVLEEDVTVPG TLSGCSGLVPSVPDDLGINPAGNLGNLLPNVSEETVSP TRARM	60
CK5P2_HUMAN	*****	
CK5P2_HUMAN	KDFENQITELKKENFNKLRIYFLPERMQQEFHGPT HEHIYK TNIELKVEVESLK RELQER	120
CK5P2_HUMAN	KDFENQITELKKENFNKLRIYFLPERMQQEFHGPT HEHIYK TNIELKVEVESLK RELQER	120
CK5P2_HUMAN	KDFENQITELKKENFNKLRIYFLPERMQQEFHGPT HEHIYK TNIELKVEVESLK RELQER	120
CK5P2_HUMAN	KDFENQITELKKENFNKLRIYFLPERMQQEFHGPT HEHIYK TNIELKVEVESLK RELQER	120
CK5P2_HUMAN	EQLLIKAS KAVESLAEAGGSEIQRVKEDARKKKVQVED LTKRIL LEKDV TAAQAELEK	180
CK5P2_HUMAN	EQLLIKAS KAVESLAEAGGSEIQRVKEDARKKKVQVED LTKRIL LEKDV TAAQAELEK	180
CK5P2_HUMAN	EQLLIKAS KAVESLAEAGGSEIQRVKEDARKKKVQVED LTKRIL LEKDV TAAQAELEK	180
CK5P2_HUMAN	EQLLIKAS KAVESLAEAGGSEIQRVKEDARKKKVQVED LTKRIL LEKDV TAAQAELEK	180
CK5P2_HUMAN	*****	
PCNT_HUMAN	MEVEQEQRRRKVEAGRTKLHAFRQRKTGDDSSHSEKKTAKRKGSAVDASVQEESPVTKED	60
PCNT_HUMAN	-----	
PCNT_HUMAN	SALCGGGDIKSTSCDDTPDGAGGAAFAAQPEDCDGKREDE LQLOQKQVNDHPP EQCGMF	120
PCNT_HUMAN	-----MF	2
PCNT_HUMAN	TVSDHPP EQHG MF TVGDH PP EQRGMFTVSDH PP EQHG MF TVSDH PP EQRGMFTISD HQPE	180
PCNT_HUMAN	TVSDHPP EQHG MF TVGDH PP EQRGMFTVSDH PP EQHG MF TVSDH PP EQRGMFTISD HQPE	62
PCNT_HUMAN	*****	
PCNT_HUMAN	Q RG MF TVSDH TP EQRGI FT ISDHPAEQ RG MF T KECEQE CE L AIT DLES GREDEAG LHQ SQ	240
PCNT_HUMAN	Q RG MF TVSDH TP EQRGI FT ISDHPAEQ RG MF T KECEQE CE L AIT DLES GREDEAG LHQ SQ	122
PCNT_HUMAN	*****	
PCNT_HUMAN	AV HGLE L EA L RA L SL N M H TA QL EL TQ AN LQ KE KT AL TEL RE ML NS RA Q EL AL LS Q RQ	300
PCNT_HUMAN	AV HGLE L EA L RA L SL N M H TA QL EL TQ AN LQ KE KT AL TEL RE ML NS RA Q EL AL LS Q RQ	182
PCNT_HUMAN	*****	
PCNT_HUMAN	HE LE LL R EQ HAREKE EV VL RC GQ EA EL KE LQ SE ME K NAQ I V KT L KED WESEK DL CL EN	360
PCNT_HUMAN	HE LE LL R EQ HAREKE EV VL RC GQ EA EL KE LQ SE ME K NAQ I V KT L KED WESEK DL CL EN	242
PCNT_HUMAN	*****	
PCNT_HUMAN	LR KL SA HK Q SE ME DL Q NQ F Q KE LA EQ RA EL E KT I Q DN QA ER AL RN LE SH H Q AA I E KL R	420
PCNT_HUMAN	LR KL SA HK Q SE ME DL Q NQ F Q KE LA EQ RA EL E KT I Q DN QA ER AL RN LE SH H Q AA I E KL R	302
PCNT_HUMAN	*****	

Figura R2. Análisis de las distintas isoformas de AKA450, CDK5Rap2 y pericentrina en células humanas. Alineamiento de las regiones N-terminal de las distintas isoformas humanas de AKAP450 (AKAP9), CDK5Rap2 (CK5P2) y pericentrina (PCNT) descritas en la base de datos UniProtKB. Los números de la derecha corresponden a la posición de los aminoácidos mostrados. Las regiones resaltadas en color indican las zonas comunes a todas las isoformas frente a las que se diseñaron los ARN guías.

El alineamiento de las secuencias de las diferentes isoformas descritas para cada una de las proteínas de interés en la base de datos UniProtKB mostró que AKAP450 presenta 6 isoformas, mientras que CDK5Rap2 y pericentrina poseen 4 y 2 respectivamente. En el caso de AKAP450 y CDK5Rap2 todas las isoformas comparten una amplia región N-terminal. Por el contrario, en el caso de pericentrina existe una isoforma (isoforma 2) que, a pesar de poseer una zona N-terminal de amplia homología con la secuencia consenso, carece de los aminoácidos codificados en los primeros exones (Figura R2).

Basándonos en este análisis, los ARN guías de cadena simple fueron diseñados frente a los primeros exones comunes a todas las isoformas, siendo éste el exón 2 en el caso de AKAP450, el exón 1 en el caso de CDK5RAP2 y el exón 5 en el de PCNT (Figura R3).

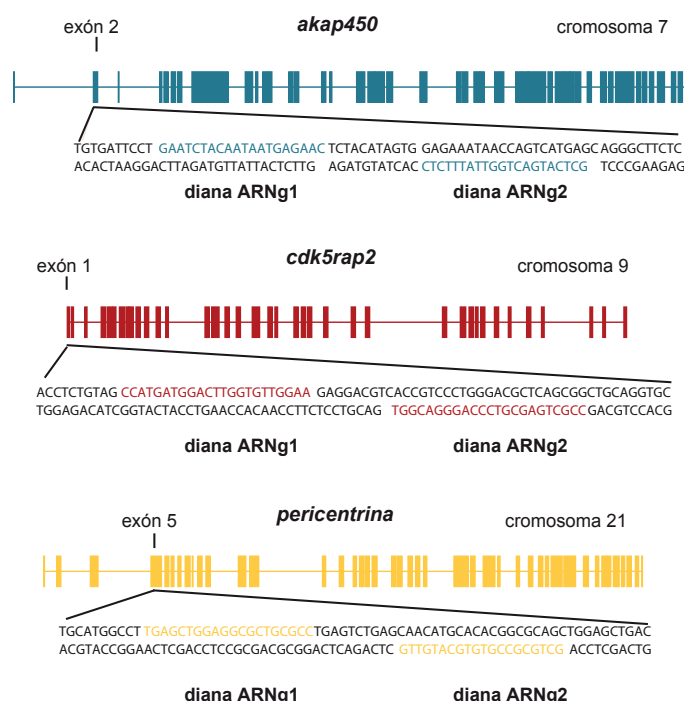


Figura R3. Representación esquemática de la secuencia genómica de *akap450*, *cdk5rap2* y *pcnt*. Representación del conjunto de exones que componen los genes de *akap450*, *cdk5rap2* y *pcnt*. En cada caso aparecen indicadas tanto el exón como las regiones genómicas (secuencia de nucleótidos que aparecen resaltados) hacia las que van dirigidas los ARN guías empleados para el mecanismo de mutagénesis.

Estas parejas de ARNs guía específicos fueron clonados en el plásmido pIFA1 obteniéndose finalmente tres plásmidos independientes: pIFA2 (AKAP450), pIFA3 (CDK5Rap2) y pIFA4 (pericentrina) que serán los empleados para la obtención de las líneas celulares knock-out (ver Materiales y Métodos para más información).

1.2 Generación y caracterización de las líneas celulares hTERT-RPE1 knock-out.

1.2.1 Análisis de las mutaciones producidas en el ADN de las líneas knock-out

Para la generación de las respectivas líneas celulares knock-out se electroporaron cada uno de los plásmidos específicos de cada gen (pIFA1, pIFA2 y pIFA3 respectivamente) en células hTERT-RPE1. La eficiencia de la transfección se evaluó por citometría de flujo utilizando como parámetro la expresión del gen reportero eGFP, que además, permitió el aislamiento de las células que habían incorporado el plásmido mediante *cell sorting* (ver Materiales y Métodos para detalles específicos del protocolo).

Pasados 4-5 días, se realizó un análisis de la eficiencia del proceso de mutagenesis mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos para cada una de las proteínas. Se utilizó como

criterio de identificación de las células knock-out la pérdida de marcaje del anticuerpo en cuestión. En todos los casos, el porcentaje de células que habían perdido la señal rondó el 10 %, lo que permitió el aislamiento de clones mediante el análisis de un número razonable de los mismos. Una vez amplificados los clones, se extrajo el ADN genómico para secuenciar las regiones génicas que se habían empleado como diana de los ARN guías de cadena simple a fin de determinar las modificaciones que se habían producido y confirmar la interrupción de la fase de lectura del gen.

A

AKAP450-wt

1 - Met Glu Asp Glu Glu Arg Gln Lys Lys Leu Glu Ala Gly Lys Ala Lys Leu Ala Gln Phe Arg Gln Arg Lys Ala Gln Ser Asp Gly - 29
30 - Gln Ser Pro Ser Lys Lys Gln Lys Lys Lys Arg Lys Thr Ser Ser Ser Lys His Asp Val Ser Ala His His Asp Leu Asn Ile Asp - 58
59 - Gln Ser Gln Cys Asn Glu Met Tyr Ile Asn Ser Ser Gln Arg Val Glu Ser Thr Val Ile Pro Glu Ser Thr Ile Met Arg Thr Leu - 87
88 - His Ser Gly Glu Ile Thr Ser His Glu Gln Gly Phe Ser Val Glu Leu Glu Ser Glu Ile ...

AKAP450-KO Clon 1

Alelo A 1 - Met Glu Asp Glu Glu Arg Gln Lys Lys Leu Glu Ala Gly Lys Ala Lys Leu Ala Gln Phe Arg Gln Arg Lys Ala Gln Ser Asp Gly - 29
30 - Gln Ser Pro Ser Lys Lys Gln Lys Lys Lys Arg Lys Thr Ser Ser Ser Lys His Asp Val Ser Ala His His Asp Leu Asn Ile Asp - 58
59 - Gln Ser Gln Cys Asn Glu Met Tyr Ile Asn Ser Ser Gln Arg Val Glu Ser Thr Val Ile Pro Glu Ser Thr **Ile Met Ser Arg Ala** - 87
88 - **Ser Leu Trp Asn Trp Lys Val Lys Phe Gln Pro Gln Gln Met Thr Ala Val Gln Arg End**

Alelo B 1 - Met Glu Asp Glu Glu Arg Gln Lys Lys Leu Glu Ala Gly Lys Ala Lys Leu Ala Gln Phe Arg Gln Arg Lys Ala Gln Ser Asp Gly - 29
30 - Gln Ser Pro Ser Lys Lys Gln Lys Lys Lys Arg Lys Thr Ser Ser Ser Lys His Asp Val Ser Ala His His Asp Leu Asn Ile Asp - 58
59 - Gln Ser Gln Cys Asn Glu Met Tyr Ile Asn Ser Ser Gln Arg Val Glu Ser Thr Val Ile Pro Glu Ser Thr **Ile Met Arg Thr Leu** - 87
88 - **Val Tyr Cys End**

AKAP450-KO Clon 2

Alelo A 1 - Met Glu Asp Glu Glu Arg Gln Lys Lys Leu Glu Ala Gly Lys Ala Lys Leu Ala Gln Phe Arg Gln Arg Lys Ala Gln Ser Asp Gly - 29
30 - Gln Ser Pro Ser Lys Lys Gln Lys Lys Lys Arg Lys Thr Ser Ser Ser Lys His Asp Val Ser Ala His His Asp Leu Asn Ile Asp - 58
59 - Gln Ser Gln Cys Asn Glu Met Tyr Ile Asn Ser Ser Gln Arg Val Glu Ser Thr Val Ile Pro Glu Ser Thr **Ile Met Arg Thr Leu** - 87
88 - **Leu Tyr Asn Asn Glu Asn Ser Thr End**

Alelo B 1 - Met Glu Asp Glu Glu Arg Gln Lys Lys Leu Glu Ala Gly Lys Ala Lys Leu Ala Gln Phe Arg Gln Arg Lys Ala Gln Ser Asp Gly - 29
30 - Gln Ser Pro Ser Lys Lys Gln Lys Lys Lys Arg Lys Thr Ser Ser Ser Lys His Asp Val Ser Ala His His Asp Leu Asn Ile Asp - 58
59 - Gln Ser Gln Cys Asn Glu Met Tyr Ile Asn Ser Ser Gln Arg Val Glu Ser Thr Val Ile Pro Glu Ser Thr **Ile Met Arg Thr Leu** - 87
88 - His **Ile Thr End**

B

CDK5RAP2-wt

1 - Met Met Asp Leu Val Leu Glu Glu Asp Val Thr Val Pro Gly Thr Leu Ser Gly Cys Ser Gly Leu Val Pro Ser Val Pro Asp Asp - 29
30 - Leu Asp Gly Ile Asn Pro Asn Ala Gly Leu Gly Asn Gly Leu Leu Pro Asn Val Ser Glu Glu Thr Val Ser Pro Thr Arg Ala Arg - 58
59 - Asn Met Lys Asp Phe Glu Asn Gln Ile Thr ...

CDK5RAP2-KO Clon 1

Alelo A La mutación elimina el codón de inicio. No se genera proteína.

Alelo B 1 - Met Met Asp Leu Val Leu Asp Leu Val Leu Lys Gly Val Gly Leu Gly Val Gly Arg Gly Arg His Arg Pro Trp Asp Ala Gln Arg - 29
30 - **Leu Gln Trp Pro Cys Ser Gln Cys Thr Arg End**

CDK5RAP2-KO Clon 2

Alelo A 1 - Met Met Asp Leu Val Leu Glu Glu Asp **Trp Thr Trp Cys Trp Lys Arg Thr Ser Pro Ser Leu Gly Arg Ser Ala Ala Val Ala** - 29
30 - **Leu Phe Pro Val Tyr Gln Met Thr Trp Met Ala Ser Thr Pro Met Leu Gly Trp Glu Met Val Cys Ser Gln Met Cys Gln Lys Lys** - 58
59 - **Gln Cys Leu Pro Pro Glu His Gly Thr End**

Alelo B 1 - Met Met Asp Leu Val Leu Asp Leu Val Leu Val Gly Leu Gly Val Gly Arg Asp Leu Val Leu Val Gly Leu Gly Val Gly Arg Gly - 29
30 - **Arg His Arg Pro Trp Asp Ala Gln Arg Leu Gln Trp Pro Cys Ser Gln Cys Thr Arg End**

C

PCNT-wt

204 - Pro Ala Glu Gln Arg Gly Met Phe Thr Lys Glu Cys Glu Gln Glu Cys Glu Leu Ala Ile Thr Asp Leu Glu Ser Gly Arg Glu Asp - 232
233 - Glu Ala Gly Leu His Gln Ser Gln Ala Val His Gly Leu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Leu Ser Leu Ser Asn Met His Thr Ala Gln - 261
262 - Leu Glu Leu Thr Gln Ala Asn Leu Gln Lys Glu Lys Glu Thr Ala Leu Thr Glu Leu Arg Glu Met Leu Asn Ser Arg Arg Ala Gln - 290
291 - Glu Leu Ala Leu Leu Gln Ser Arg Gln Gln His Glu Leu Glu Leu Leu Arg Glu Gln His Ala Arg Glu Lys Glu Glu Val Val Leu - 319
320 - Arg Cys Gly Gln Glu Ala Ala Glu Leu Lys Glu Lys Leu Gln Ser Glu Met Glu Lys Asn Ala Gln Ile Val Lys Thr Leu Lys ... - 348

PCNT-KO Clon 1

Alelo A 204 - ... Ala Glu Gln Arg Gly Met Phe Thr Lys Glu Cys Glu Gln Glu Cys Glu Leu Ala Ile Thr Asp Leu Glu Ser Gly Arg Glu Asp - 232
233 - Glu Ala Gly Leu His Gln Ser Gln Ala Val His Gly Leu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Leu Ser Leu **Gln His Ala His Gly Ala Ala** - 261
262 - **Gly Ala Asp Thr Gly Gln Pro Pro Glu Gly Glu Gly Asp Gly Ile Asp Gly Ala Ala Gly Asp Ala Gln Gln Pro Ala Cys Pro Gly** - 290
291 - **Ala Gly Pro Ala Thr Glu Gln Ala Ala Ala Arg Ala Gly Ala Pro Gln Gly Ala Ala Arg Thr Gly Glu Gly Gly Gly Ala Gln** - 319
320 - **Val Trp Thr Gly Ser Ser End** - 348

Alelo B 204 - ... Ala Glu Gln Arg Gly Met Phe Thr Lys Glu Cys Glu Gln Glu Cys Glu Leu Ala Ile Thr Asp Leu Glu Ser Gly Arg Glu Asp - 232
233 - Glu Ala Gly Leu His Gln Ser Gln Ala Val His Gly Leu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Leu Ser Leu Ser Asn Met His Thr Ala **Arg** - 261
262 - **Trp Arg Arg Cys Ala End** - 290

PCNT-KO Clon 2

Alelo A 204 - ... Ala Glu Gln Arg Gly Met Phe Thr Lys Glu Cys Glu Gln Glu Cys Glu Leu Ala Ile Thr Asp Leu Glu Ser Gly Arg Glu Asp - 232
233 - Glu Ala Gly Leu His Gln Ser Gln Ala Val His Gly Leu Glu Leu **Ala His Gly Ala Ala Gly Ala Asp Thr Gly Gln Pro Pro Glu** - 261
262 - **Gly Glu Gly Asp Gly Ile Asp Gly Ala Ala Gly Asp Ala Gln Gln Pro Ala Cys Pro Gly Ala Gly Pro Ala Thr Glu Gln Ala Ala** - 290
291 - **Ala Arg Ala Gly Ala Pro Arg Gly Ala Ala Arg Thr Gly Glu Gly Gly Gly Ala Gln Val Trp Thr Gly Ser Ser End** - 319

Alelo B 204 - ... Ala Glu Gln Arg Gly Met Phe Thr Lys Glu Cys Glu Gln Glu Cys Glu Leu Ala Ile Thr Asp Leu Glu Ser Gly Arg Glu Asp - 232
233 - Glu Ala Gly Leu His Gln Ser Gln Ala Val His Gly Leu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Leu Ser Leu Ser **Val Cys Ala End** - 261

D**PCNT-KO AKAP450-KO Clon 1**
AKAP450 (secuencia aa)

Alelo A 1 - Met Glu Asp Glu Glu Arg Gln Lys Lys Leu Glu Ala Gly Lys Ala Lys Leu Ala Gln Phe Arg Gln Arg Lys Ala Gln Ser Asp Gly - 29
 30 - Gln Ser Pro Ser Lys Lys Gln Lys Lys Lys Arg Lys Thr Ser Ser Lys His Asp Val Ser Ala His His Asp Leu Asn Ile Asp - 58
 59 - Gln Ser Gln Cys Asn Glu Met Tyr Ile Asn Ser Ser Gln Arg Val Glu Ser Thr Val Ile Pro Glu Ser Thr Ile Met Arg Thr Leu - 87
 88 - **Leu Met Ser Arg Ala Ser Leu Trp Asn Trp Lys Val Lys Phe Gln Pro Gln Gln Met Thr Ala Val Gln Arg End ...**

Alelo B Se genera una mutación de más de 500 aa afectando a la mayor parte del exón 2.

E**PCNT-KO CDK5RAP2-KO Clon 1**
CDK5RAP2 (secuencia aa)

Alelo A La mutación elimina el codón de inicio. No se genera proteína.

Alelo B La mutación elimina el codón de inicio. No se genera proteína.

Figura R4. Secuencia de aminoácidos putativa de las formas truncadas de AKAP450, CDK5Rap2 y PCNT generadas en las líneas celulares knock-out. (A-C) Secuencias de aminoácidos de las proteínas AKAP450 (A), CDK5Rap2 (B) y PCNT (C) que se expresarían (en el caso de que así fuera) en cada uno de los clones seleccionados para este trabajo y predichas a partir de los datos de secuenciación del ADN genómico de éstos. Las secuencias de las proteínas no truncadas (WT) también se muestran para poder comparar. El texto en rojo indica la secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia silvestre hasta la aparición de un codón de STOP. El alelo A de *cdk5rap2* en el *cdk5rap2* KO clon 1 y ambos alelos en el *pc-c5-2KO* clon1 presentan una delección que afecta al codón de inicio presente en el exón 1, por lo que no se va a generar proteína alguna. En el resto de casos, se han generado diferentes inserciones o delecciones que provocan la aparición de codones de STOP prematuros. **(D-E)** Secuencia de aminoácidos de las proteínas putativas AKAP450 y CDK5Rap2 presentes en las líneas celulares dobles knock-out, *pc-ak-2KO* y *pc-c5-2KO*. En ambos casos, las líneas celulares doble knock-out se generaron a partir de la línea *pcnt* KO obtenida previamente. En este caso, solo se muestra la información para uno de los dos clones.

Tales análisis confirmaron que las diferentes mutaciones generadas como consecuencia del corte de doble cadena producido por acción de la nickasa (Cas9n), originaron la aparición de codones de STOP prematuros en los dos alelos de los genes en cuestión. Como se muestra en la figura R4, en caso de expresarse, las secuencias de aminoácidos de las posibles proteínas truncadas no superarían los 400 aa en ninguno de los casos o serían incluso inexistentes al afectar la mutación al propio codón de inicio.

Para descartar la posibilidad de que pudieran generarse en las líneas mutantes proteínas truncadas a partir de los genes mutados, afectando así a la interpretación de los resultados, realizamos experimentos de pPCR de los clones obtenidos. Obtuvimos cDNA de los distintos clones y lo empleamos como molde usando diferentes parejas de cebadores distribuidos a lo largo de toda la secuencia del ARN mensajero (ARNm). Como control se empleó cDNA procedente de las células silvestres (WT). Tal y como se aprecia en la figura R5, la expresión de todos los fragmentos de ARNm analizados disminuyó en torno al 90% independientemente de la región amplificada, hecho que es compatible con el proceso de degradación del ARN mensajero mediada por la presencia de mutaciones terminadoras (*Nonsense Mediated Decay* en inglés). Dicho mecanismo detecta la aparición de mutaciones terminadoras prematuras, y de este modo, evitar la expresión de proteínas truncadas que pudieran ser perniciosas para la célula (Hug, Longman, and Cáceres 2015).

Para el caso de la generación de las líneas celulares dobles mutantes *pcnt/akap450* y *pcnt/cdk5rap2*, se usó como base la línea *pcnt* KO ya caracterizada y sobre ésta se transfectaron los mismos plásmidos anteriormente utilizados para la obtención de los mutantes simples para AKAP450 y CDK5Rap2. La caracterización de ambos dobles mutantes se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento empleado para la identificación de los mutantes simples (ver Figura R3 y R4).

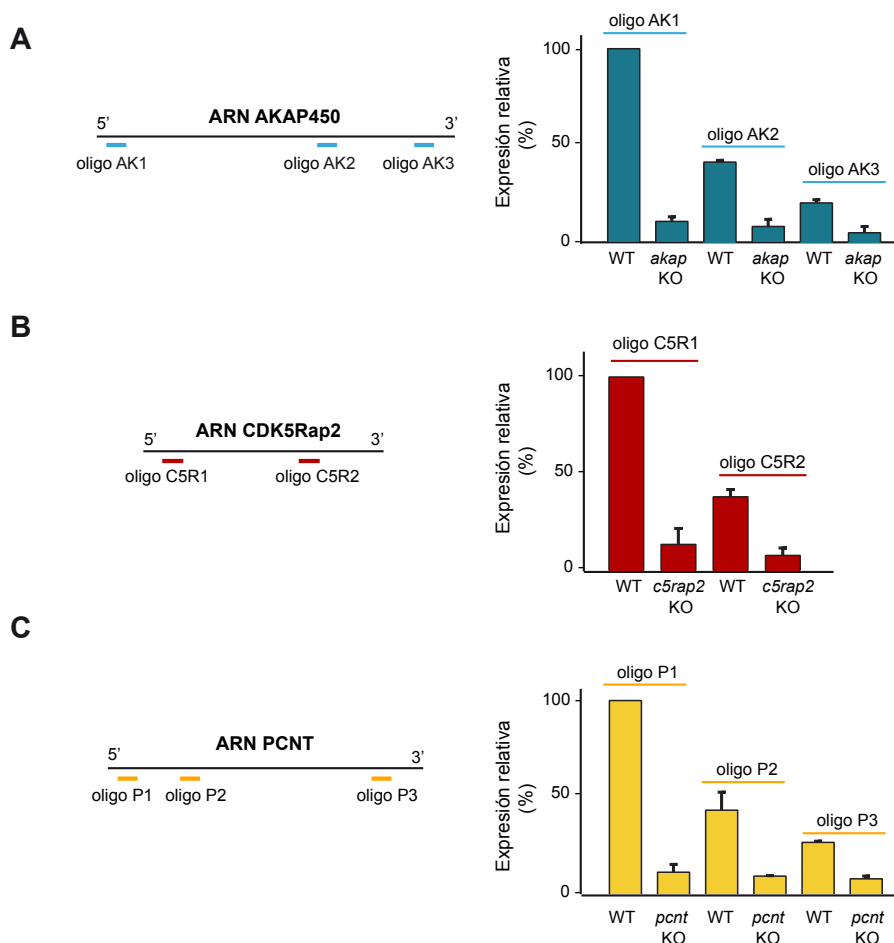


Figura R5. Análisis y caracterización de las líneas celulares knock-out a nivel de ARN. Eliminación del ARNm por medio del mecanismo de RNA decay. (A-C) Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de ARNm de AKAP450 (A), CDK5Rap2 (B) y PCNT (C) en células controles y líneas celulares knock-out. Se emplearon distintas parejas de oligos para regiones específicas distribuidas a lo largo de toda la secuencia. A la izquierda aparecen las representaciones esquemáticas de las secuencias de ARNm y la región específica que amplifica cada pareja de oligos. Se usaron tres parejas de oligos en el caso de AKAP450 y PCNT y dos parejas en el caso de CDK5Rap2. La GAPDH se usó como *housekeeper*. Los niveles de ARN en cada caso fueron referidos a los respectivos niveles de ARN en células WT amplificadas con la pareja de oligos situada en la región más próxima al extremo 5' (valores expresados en %). Las gráficas muestran los valores de la media \pm DE de dos experimentos diferentes para cada caso (tres réplicas cada uno de ellos). Ver Materiales y Métodos para las secuencias de oligos.

1.2.2 Análisis a nivel de proteínas.

1.2.2.1 Caracterización y generación de anticuerpos

Una vez aisladas y caracterizadas las líneas celulares knock-out, procedimos al análisis de las proteínas mutantes respectivas mediante ensayos de *western blot* (WB) y ensayos de inmunofluorescencia (IF). Para ello, empleamos una batería de anticuerpos capaces de reconocer distintos epítomos distribuidos a lo largo de toda la proteína (de forma similar a cómo se hizo a nivel de ARNm). Previamente validamos la especificidad cada uno de ellos frente a la región contra la que habían sido generados para, de este modo, garantizar tanto la ausencia tanto de la proteína endógena como de algún subproducto truncado. En total se emplearon 4 anticuerpos anti-AKAP450, 4 anticuerpos anti-PCNT y 3 anticuerpos anti-CDK5Rap2 (ver Figura R6 y Materiales y Métodos).

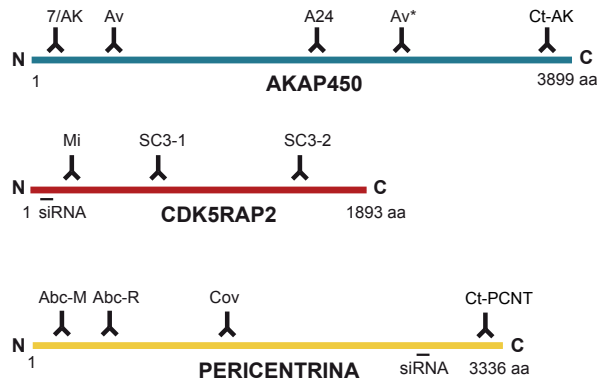


Figura R6. Representación esquemática de los epítomos reconocidos por los anticuerpos empleados en el estudio. Representación esquemática de la secuencia completa de aminoácidos de las isoformas mayoritarias de AKAP450, CDK5Rap2 y pericentrina; indicándose en cada caso los epítomos reconocidos por los diferentes anticuerpos empleados en este trabajo. En el caso de CDK5Rap2 y pericentrina también se muestra la región que hibrida con los siRNAs empleados en el estudio. Av* hace referencia a un epítomo reconocido por el anticuerpo Av no indicado por la casa comercial. (Ver Materiales y Métodos para referencias).

Todos ellos se demostraron específicos frente a sus epítomos, excepto el anticuerpo policlonal anti-AKAP450 de la casa comercial *Aviva Biosystems* (Av), que había sido generado frente a la región N-terminal de la proteína. Para caracterizarlo en profundidad, expresamos de forma exógena la proteína completa dividida en 4 grandes fragmentos que denominamos de AK1 a AK4 (Hurtado et al. 2011), todos ellos fusionados a la proteína fluorescente GFP. Como se observa en la figura R7 el anticuerpo reconocía además de la región N-terminal, una región comprendida entre los aminoácidos 1708 y 2875 (correspondiente al fragmento AK3 (Hurtado et al. 2011)). Este dato es relevante a la hora de identificar, si ese fuera el caso, la presencia de alguna isoforma corta de AKAP450 que no contuviera el exón frente al que se habían diseñado los ARNs guías.

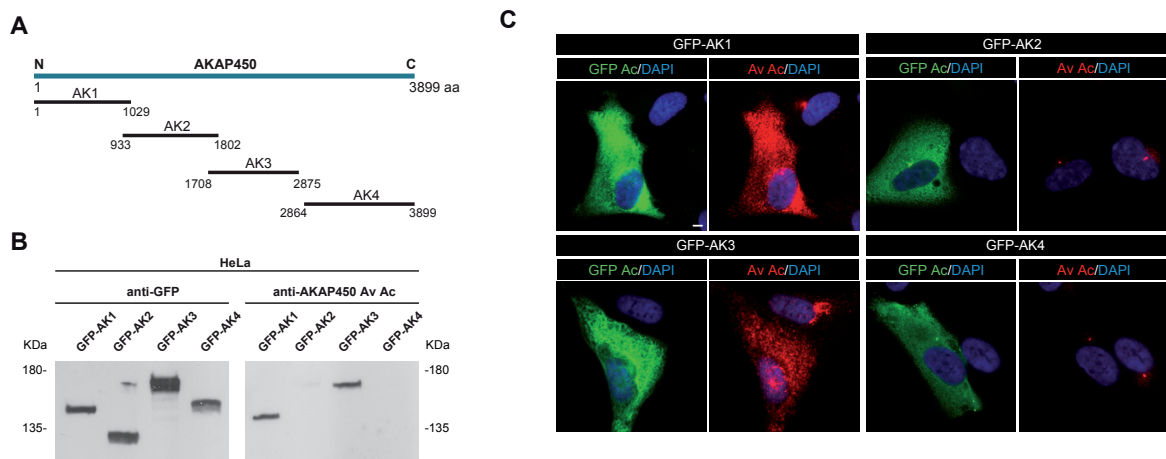


Figura R7. Caracterización del anticuerpo anti-AKAP450 comercial Aviva (Av). (A) Diagrama esquemático del tamaño y distribución de los cuatro truncados de AKAP450 empleados para la caracterización del anticuerpo anti-AKAP450 comercial Aviva. Los números representan la posición de los aminoácidos en la secuencia completa. (B) WB de extractos totales de células HeLa transfectadas con los fragmentos AK1, AK2, AK3 y AK4 fusionados a GFP y analizados con los anticuerpos anti-GFP y anti-AKAP450 Av. (C) Células HeLa transfectadas con GFP-AK1, GFP-AK2, GFP-AK3 y GFP-AK4 fueron fijadas y marcadas con los anticuerpos anti-GFP (verde), anti-AKAP450 Av (rojo) y DAPI (azul). El anticuerpo anti-AKAP450 Av reconoció las células que expresaban (GFP positivas) los fragmentos AK1 o AK3, respectivamente. Barra de escala 5 µm.

Generación de anticuerpos anti-CDK5Rap2

Para la caracterización de los clones mutantes en el gen *cdk5rap2* no se disponía de anticuerpos que reconocieran la mitad C terminal de la proteína pues la mayoría de los anticuerpos existentes en el mercado habían sido generados frente a epítomos situados en la región más N-terminal. Dado que esta limitación suponía un problema a la hora de garantizar la ausencia de productos proteicos generados por la aparición de algún inicio de transcripción alternativo o la existencia de isoformas cortas, generamos dos anticuerpos policlonales anti-CDK5Rap2: SC3-1 y SC3-2, capaces de reconocer la región media y C-terminal de la proteína respectivamente (ver Materiales y Métodos para más información). En ensayos de IF, ambos presentaban un marcaje en el centrosoma y en el AG característico de CDK5Rap2. Sin embargo, sólo el SC3-1 daba señal positiva en experimentos de WB (Figura R8 y R9). Para demostrar que el marcaje revelado en IF por el anticuerpo SC3-2 correspondía a la proteína CDK5Rap2 realizamos experimentos de inmunoprecipitación sobre extractos de células WT y clones knock-out de CDK5Rap2, usando el anticuerpo SC3-2. Los inmunoprecipitados fueron posteriormente analizados por WB utilizando el anticuerpo comercial Mi Ac (Millipore). Como se observa en la figura R8, el anticuerpo SC3-2 inmunoprecipitó una banda que correspondía a CDK5Rap2 en extractos de células WT que estaba ausente en las líneas mutantes, confirmando así la especificidad del anticuerpo.

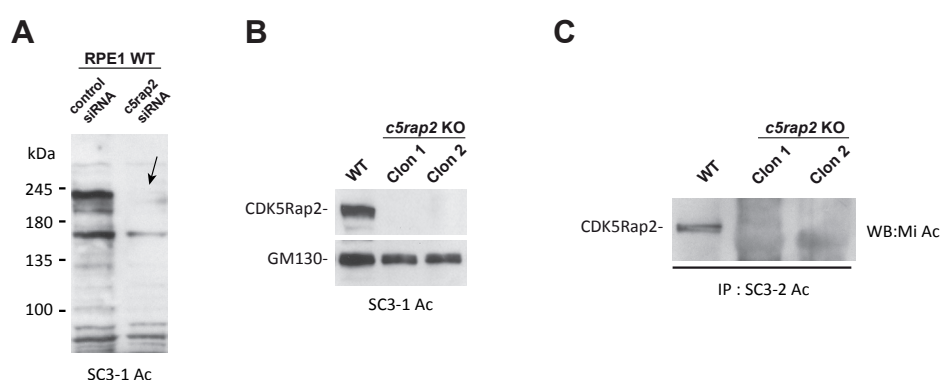


Figura R8. Caracterización de los dos anticuerpos policlonales (anti-CDK5Rap2 SC3-1 y SC3-2) generados durante el desarrollo de este estudio. (A) Extractos totales procedentes de RPE1 WT y transfectadas con siRNA CDK5Rap2 fueron analizadas por WB con el anticuerpo anti-CDK5Rap2 SC3-1. La flecha indica la banda específica que desaparece en las células tratadas con el siRNA. **(B)** WB de extractos totales de células RPE1 WT y clones *cdk5rap2* KO (*c5rap2* KO) analizados con el anticuerpo policlonal anti-CDK5Rap2 SC3-1. GM130 fue utilizado como control de carga. **(C)** Inmunoprecipitación de extractos totales de células RPE1 WT y clones *cdk5rap2* KO usando el anticuerpo anti-CDK5Rap2 SC3-2. Los inmunoprecipitados fueron posteriormente examinados mediante WB para detectar la presencia de CDK5Rap2 usando el anticuerpo anti-CDK5Rap2 comercial Millipore (Mi).

1.2.2.2 Caracterización de los diferentes clones knock-out

Una vez caracterizados todos los anticuerpos, procedimos al análisis de las diferentes líneas celulares knock-out (al menos dos clones de cada una de ellas) mediante WB. No se observó ninguna señal específica en los extractos proteicos totales de ninguno de los clones analizados de las diferentes líneas celulares mutantes (*akap450* KO, *cdk5rap2* KO, *pcnt* KO, *pcnt/akap450* KO y *pcnt/cdk5rap2* KO), al compararlos con extractos WT (Figura R9). Lo mismo ocurrió en ensayos de IF, donde no se veía ningún

marcaje específico con ninguno de los anticuerpos anti-CDK5Rap2 y anti-PCNT en sus correspondientes clones knock-out (simples o dobles; Figura R9), demostrando de nuevo la ausencia de ambas proteínas en todos los casos. En las líneas celulares mutantes de AKAP450, 3 de los 4 anticuerpos usados tampoco revelaron ningún marcaje ni en los clones *akap450* KO ni en el doble mutante *pcnt/akap450* KO. Sin embargo, se detectó una señal centrosómica residual al emplear el anticuerpo de Aviva (Av) (Figura R9).

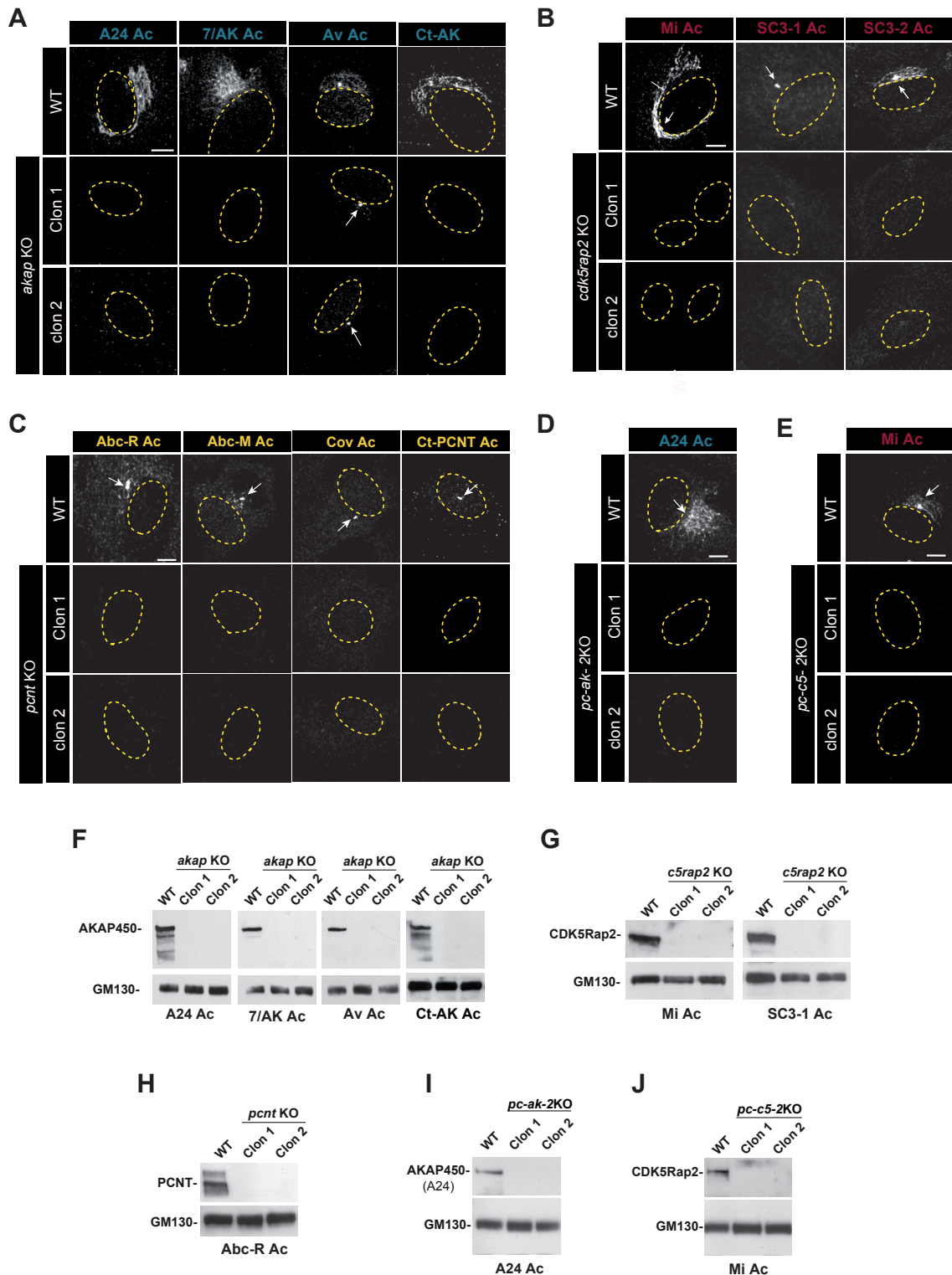


Figura R9. Caracterización de las líneas celulares *akap450* KO, *cdk5rap2* KO, *pcnt* KO, *pcnt/akap450* KO y *pcnt/cdk5rap2* KO a nivel de proteína. (A-E) Células RPE1 WT, *akap450* KO (*akap* KO) (A), *cdk5rap2* KO (*c5rap2* KO) (B), *pcnt* KO (C), *pcnt/akap450* KO (*pc-ak-2KO*) (D) y *pcnt/cdk5rap2* KO (*pc-c5-2KO*) (E) fueron fijadas y marcadas con los anticuerpos indicados en cada caso (paneles superiores). Las flechas apuntan a los centrosomas. En el caso del anticuerpo anti-AKAP450 Av (B), las flechas indican un marcaje inespecífico de éste en el centrosoma de los dos clones *akap450* KO. Las líneas discontinuas amarillas hacen referencia al contorno del núcleo. (F-J) Extractos totales de células RPE1 WT, *akap450* KO (F), *cdk5rap2* KO (G), *pcnt* KO (H), *pcnt/akap450* KO (I) y *pcnt/cdk5rap2* KO (J) fueron analizados con los anticuerpos indicados en cada caso. Sólo se emplearon aquellos anticuerpos que eran funcionales en ensayos de WB. GM130 se empleó como control de carga en (F-J). Barra de escala, 5 µm.

A pesar de este marcaje, el hecho de que el resto de anticuerpos usados (incluyendo el denominado Ct-AK que reconoce la región más C-terminal de la proteína) no revelen ninguna señal centrosómica en los diferentes mutantes junto con los resultados de qPCR mostrados anteriormente (ver Figura R5), arguyen que la señal detectada sea probablemente inespecífica, lo que no es inhabitual en sueros no inmunizados de conejos como se ha descrito en artículos previos.

En conclusión, los resultados obtenidos mediante secuenciación, qPCR, IF, y WB demuestran la idoneidad de las líneas celulares mutantes generadas para la consecución de los objetivos planteados pues apuntan a una ausencia completa de las correspondientes proteínas de interés.

1.1.1.3. Caracterización de la estabilidad de los complejos proteicos

Puesto que AKAP450, CDK5Rap2 y PCNT interaccionan in vivo (Barr, Kilmartin, and Gergely 2010; Buchman et al. 2010; Takahashi et al. 2002) formando diferentes tipos de complejos, la ausencia de alguno de ellos podría afectar a los niveles proteicos de cualquiera de las otras proteínas. Por ello, analizamos cuantitativamente los niveles de cada una de las proteínas mediante ensayos de WB a partir de extractos totales de todas las líneas knock-out generadas.

Los resultados obtenidos demuestran que la eliminación de PCNT y CDK5Rap2 tanto por separado como de manera conjunta (*pcnt* KO, *cdk5rap2* KO y *pcnt/cdk5rap2* KO) provoca variaciones en los niveles de las otras proteínas que oscilan entre el 90 y el 125 % con respecto a los valores presentes en las células silvestres (Figura R10).

La eliminación de AKAP450 produjo diferencias más significativas. En ensayos de IF se observó la pérdida del marcaje de CDK5Rap2 en el AG confirmando resultados previos (Wang et al. 2010; Wu et al. 2016). Esto podría deberse a la incapacidad de CDK5Rap2 de asociarse al AG en ausencia de AKAP450 o a la degradación de la proteína en las mismas condiciones (ver Figura R6). La cuantificación de los valores totales de CDK5Rap2 en los clones *akap450* KO, reveló una disminución del 40% respecto a los niveles observados en el WT. Esta disminución fue más acusada en los dobles mutantes *pcnt/akap450* KO, quienes sólo contenían el 20% de la proteína con respecto a las células silvestres (ver Figura R10). Estos resultados indican que, la estabilidad de la proteína CDK5Rap2 depende de la presencia de AKAP450 y PCNT y en su ausencia se degrada, por lo que la línea doble mutante *pcnt/akap450* KO puede considerarse *de facto* triple mutante AKAP450/CDK5Rap2/PCNT.

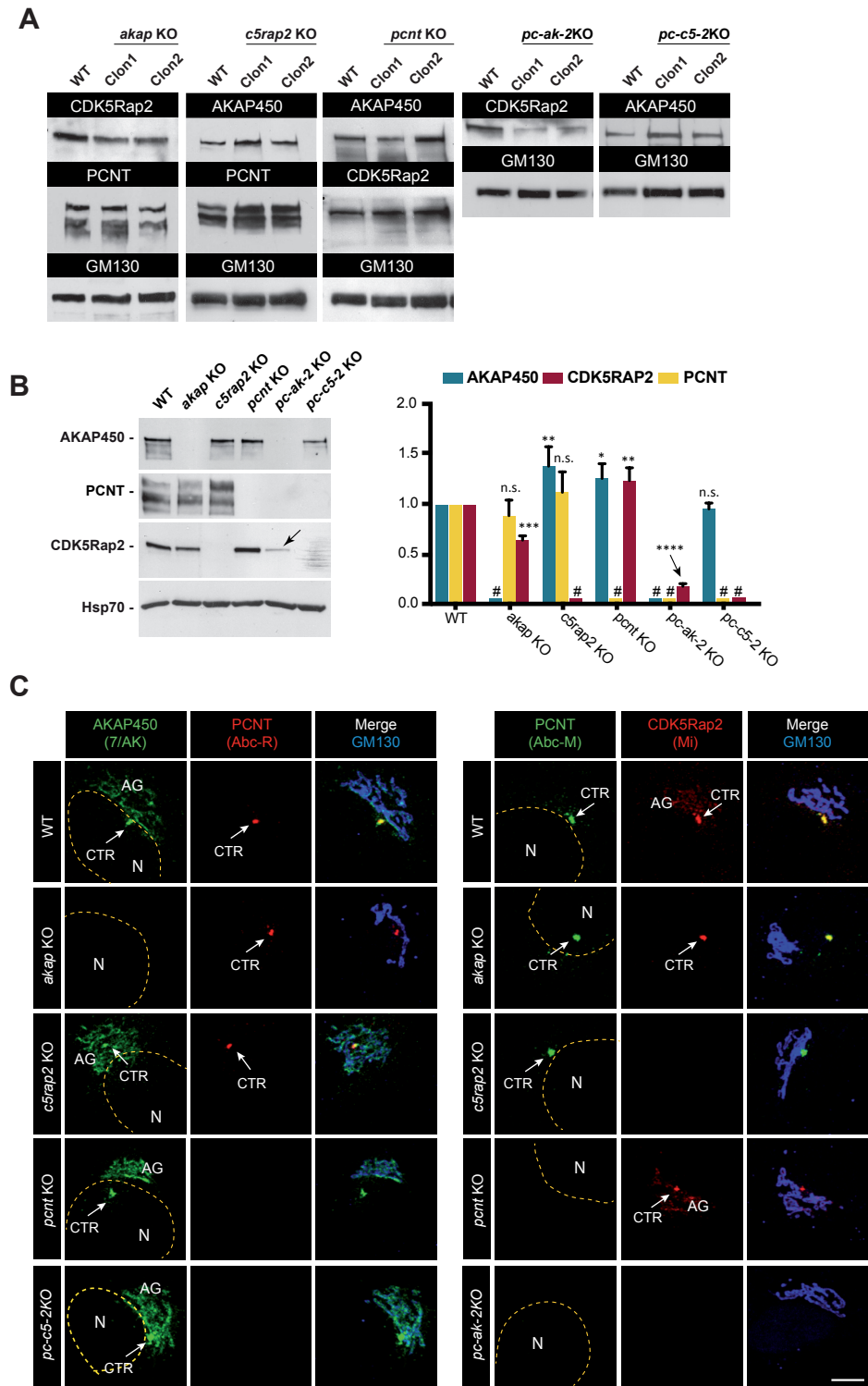


Figura R10. Análisis de los niveles de AKAP450, CDK5Rap2 y PCNT en todas las líneas knock-out. (A) Extractos totales de células RPE1 WT, *akap450* KO (*akap* KO), *cdk5rap2* KO (*c5rap2* KO), *pcnt* KO, *pcnt/akap450* KO (*pc-ak-2* KO) y *pcnt/cdk5rap2* KO (*pc-c5-2* KO) fueron analizados con los anticuerpos indicados en cada caso. Se emplearon dos clones por cada línea celular. GM130 se utilizó como control de carga. **(B)** (Izquierda) WB representativo de extractos totales de RPE1 WT y las líneas knock-out indicadas analizados con anticuerpos anti-AKAP450 (A24), anti-CDK5Rap2 (Mi) y anti-PCNT (Abc-M). (derecha) Análisis densitométrico de tres experimentos como el mostrado a la izquierda. # representa la proteína para la que cada línea celular es mutante. La flecha indica el significativo descenso de los niveles de CDK5Rap2 observado en los extractos de la línea *pcnt/akap450* KO. Las barras representan los valores de la media \pm DE de tres experimentos independientes. Todos los valores fueron normalizados con respecto a los obtenidos en los extractos RPE1 WT. Hsp70 se utilizó como control de carga.

(C) Células RPE1 WT, *akap450* KO, *cdk5rap2* KO, *pcnt* KO, *pcnt/akap450* KO y *pcnt/cdk5rap2* KO fueron fijadas y marcadas con los anticuerpos indicados para observar la distribución de las proteínas de interés en cada caso. Las líneas de puntos amarillas hacen referencia al contorno del núcleo (N) y las flechas apuntan hacia los centrosomas (CTR). El Aparato de Golgi aparece indicado como AG. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA seguida de un test de Dunnett's. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; n.s.= no significativo. Barra de escala, 5 μm .

CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE LA NUCLEACIÓN DE MICROTÚBULOS DESDE EL CENTROSOMA Y EL APARATO DE GOLGI EN INTERFASE

La organización y el dinamismo de la red de MTs es esencial para garantizar el correcto funcionamiento y actividad de la misma. Es una idea ampliamente aceptada que la nucleación de MTs se regula mediante el control del reclutamiento de γ -tubulina a los MTOCs. Tal reclutamiento depende a su vez de la localización en los mismos de las proteínas de unión a γ TURC. Hasta la fecha, se ha considerado que los principales reclutadores de γ TuRCs son las proteínas AKAP450, PCNT, CDK5Rap2 y Miomegalina. Si esto fuera así, cualquier alteración de los mismos debería afectar al proceso de nucleación de MTs y por ende al citoesqueleto microtubular. En este capítulo se abordará el papel de cada uno de estos reclutadores en los mecanismos de nucleación de MTs así como su mayor o menor relevancia en el funcionamiento de los diferentes MTOCs de la célula.

2.1. Papel de los principales reclutadores de γ TURCs en la nucleación de MTs

Nuestro primer objetivo fue el de manipular estos factores clave en el reclutamiento de γ -tubulina y analizar su papel en la nucleación de MTs desde los dos principales MTOCs de la célula: el centrosoma y el AG, con un especial interés en determinar la existencia de algún tipo de coordinación entre ambos.

2.1.1. Papel de los factores de unión a γ TURCs en el centrosoma.

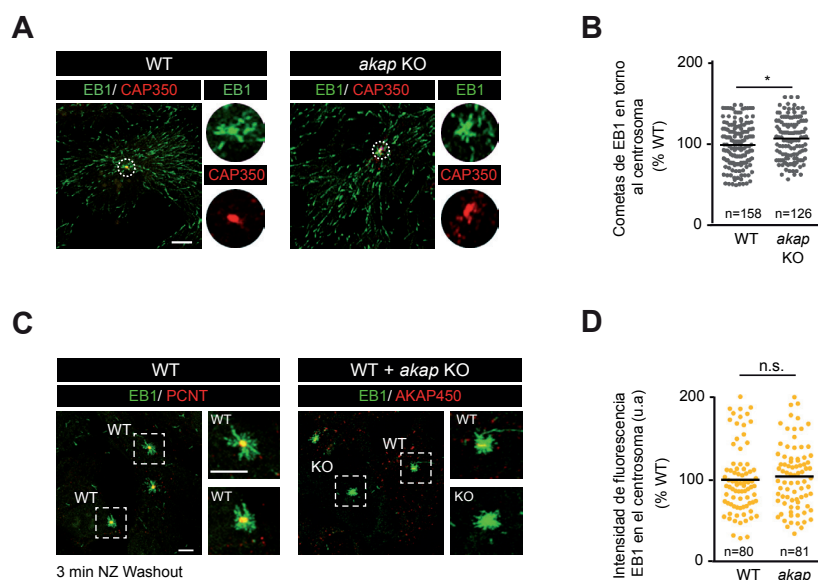
Evalúamos la capacidad de nucleación desde el centrosoma usando dos aproximaciones diferentes aunque complementarias:

- a) **Análisis de la densidad del “áster” de MTs del centrosoma en ensayos de repolimerización tras un tratamiento con nocodazole (NZ).** El nocodazole es una droga que inhibe la polimerización de MTs. Tras un periodo de tiempo en presencia del mismo (30-90 min dependiendo del tipo celular), la red de MTs desaparece y solo se detectan dímeros de tubulina soluble. Tras el lavado de la droga, los nuevos MTs se generan rápidamente (1-5 min) desde los diferentes MTOCs celulares. Como consecuencia del tratamiento, el AG se fragmenta en pequeñas pilas de cisternas dispersas por el citoplasma, separándolo así del centrosoma y facilitando el análisis de la nucleación desde éste. Dada la rapidez del proceso de repolimerización, el análisis cuantitativo del proceso de nucleación es muy sensible a las condiciones de tiempo y temperatura en las que se realizan. Para superar este inconveniente, todos los experimentos se llevaron a cabo en poblaciones mezcladas de células WT y células KO.
- b) **Determinación del número de cometas de EB1** (proteína de unión a los extremos en crecimiento del MT) **que surgen del centrosoma** como estimación de la cantidad de MTs nucleados en un momento dado en presencia de una red intacta de MTs (Ver Materiales y Métodos para detalles del procedimiento de cuantificación).

2.1.1.1. Papel de AKAP450

Estudios previos de nuestro laboratorio, confirmados por otros, habían demostrado que la nucleación de MTs desde el AG es dependiente de AKAP450 (Rivero et al. 2009). Tales estudios no resultaron informativos sobre el papel de AKAP450 en el centrosoma pues los experimentos, realizados mediante siRNA, no eliminaban la población centrosómica de la proteína. Ese problema estaba resuelto en las células knock-out que habíamos generado. La cuantificación de la capacidad nucleadora del

centrosoma estimada utilizando las dos aproximaciones anteriormente descritas, no mostró cambios significativos entre la línea celular *akap450* KO y las células WT, 96 y 98 % respectivamente con respecto a las células WT (Figura R11).



para cuantificar el número de cometas de EB1 existentes en dicha área. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT. (C) Mezclas de células RPE1 WT con células RPE1 *akap450* KO fueron incubadas con NZ (10 μ M) durante 3 horas y posteriormente reincubadas a 37°C durante 3 minutos en medio fresco tras el lavado de la droga. Después de su fijación, las células fueron teñidas con anti-EB1 (verde) y anti-AKAP450 (rojo) a fin de poder identificar las células knock-out. Los recuadros se muestran ampliificados en la parte derecha de cada imagen. (D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de EB1 alrededor del centrosoma en tres experimentos independientes como los mostrados en (C). Los valores están normalizados con respecto a la media de los valores obtenidos para las células WT.

Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student. * $p < 0.05$; n.s.= no significativo. Barra de escala, 5 μ m.

Estos resultados indican que i) la inhibición de nucleación de MTs desde el AG no afecta significativamente a la actividad nucleadora de MTs del centrosoma, es decir, que éste actúa como un MTOC autónomo e independiente, y ii) que AKAP450 es prescindible para el mecanismo de nucleación de MTs desde el centrosoma.

2.1.1.2. Papel de PCNT y CDK5Rap2

Para evaluar la contribución de los otros principales factores reclutadores de complejos γ TuRC a la nucleación de MTs desde el centrosoma, procedimos a analizar mediante las mismas aproximaciones descritas anteriormente las líneas KO simples de *cdk5rap2* y *pcnt* así como las dobles mutantes *pcnt/akap450* y *pcnt/cdk5rap2*.

Curiosamente, y a pesar de que tanto CDK5Rap2 como PCNT habían sido descritas como proteínas esenciales en la nucleación de MTs, al menos en mitosis (Choi et al. 2010; Fong et al. 2008; Ma and Viveiros 2014), los experimentos revelaron que ninguno de los mutantes simples presentaba grandes

alteraciones, aunque sí significativas, ni cuando se examinaban en los ensayos de repolimerización de MTs tras nocodazole ni cuando se calculaban los números de cometas de EB1. Así, los mutantes de CDK5Rap2 mostraban valores del 90 y 86% respectivamente, mientras que en los mutantes de PCNT fueron del 88 y 85% con respecto a las células WT (ver Figura R12).

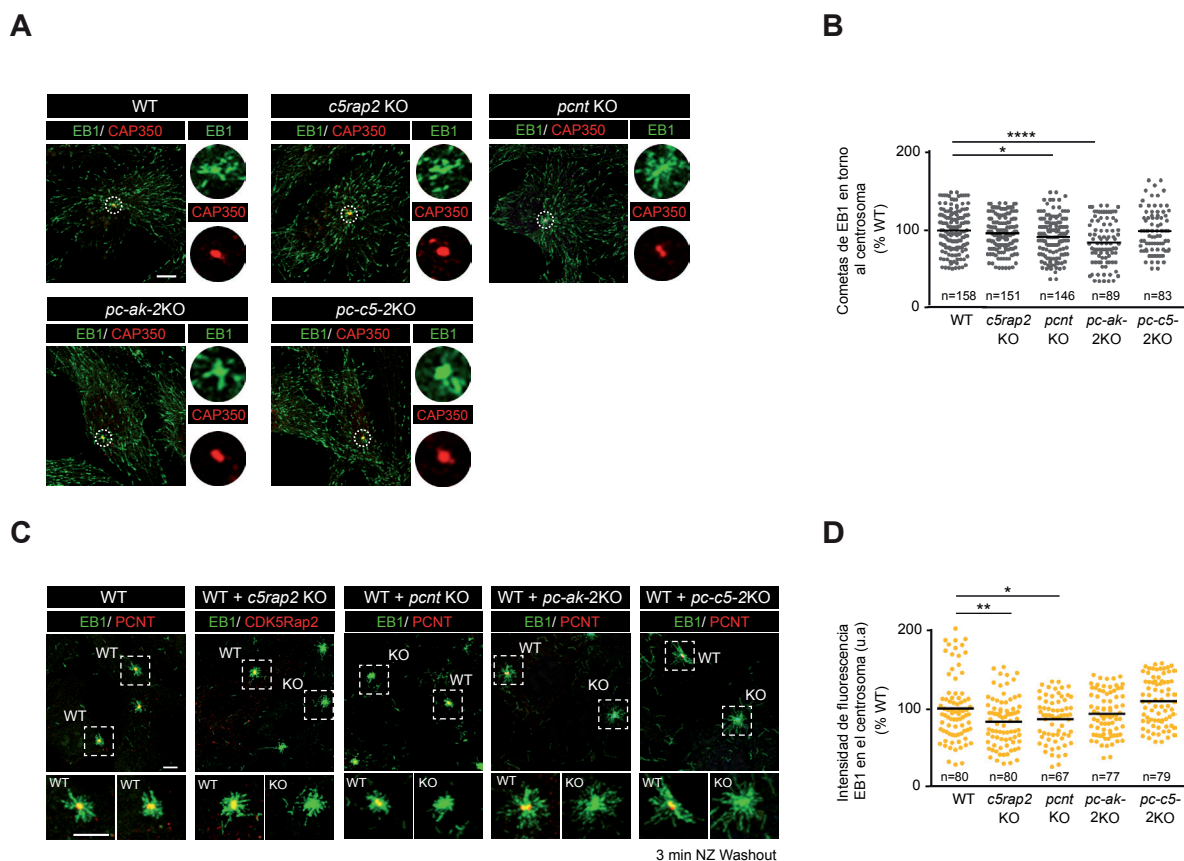


Figura R12. Análisis de la nucleación de MTs desde el centrosoma en las líneas celulares *cdk5rap2*, *pcnt*, *pcnt/akap450* y *pcnt/cdk5rap2* knock-out. (A) Imágenes de microscopía confocal de células RPE1 WT, *cdk5rap2* KO (c5rap2 KO), *pcnt* KO, *pcnt/akap450* KO (*pc-ak-2KO*) y *pcnt/cdk5rap2* KO (*pc-c5-2KO*) fijadas y marcadas con los anticuerpos anti-EB1 (verde) y anti-CAP350 (rojo). A la derecha se observan ampliificaciones de las áreas seleccionadas, mostrándose los canales individuales por separado. (B) Cuantificación del número de cometas de EB1 presentes alrededor del centrosoma en tres experimentos independientes como los mostrados en (A). Se determinó una región de interés de 3 μm de radio entorno a la señal de CAP350 y se empleó para cuantificar el número de cometas de EB1 existentes en dicho área. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT. (C) Mezclas de células RPE1 WT con células RPE1 *cdk5rap2* KO, *pcnt* KO, *pcnt/akap450* KO o *pcnt/cdk5rap2* KO fueron incubadas con NZ (10 μM) durante 3 horas y posteriormente reincubadas a 37°C durante 3 minutos en medio fresco tras el lavado de la droga. Después de su fijación, las células fueron teñidas con anti-EB1 (verde) y anti-CDK5Rap2 o anti-PCNT (rojo) tal y como se indica a fin de poder identificar las células knock-out. Los recuadros se muestran ampliados en la parte inferior de cada imagen. (D) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de EB1 alrededor del centrosoma en tres experimentos independientes como los mostrados en (C). Los valores están normalizados con respecto a la media de los valores obtenidos para las células WT. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA seguida de un test de Dunnett's. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. Barra de escala, 5 μm .

Sorprendentemente, resultados similares se obtuvieron cuando se analizaron las líneas dobles mutantes. Incluso en el caso del doble mutante PCNT/AKAP450, en el que como ya vimos con anterioridad, los niveles de CDK5Rap2 se reducían más del 80% (Figura R10) y que carecerían igualmente de miomegalina en el centrosoma de acuerdo con resultados previos (Roubin et al. 2013), la nucleación de MTs desde el centrosoma aparece prácticamente inalterada, reduciéndose sólo en un 10% el número de cometas de EB1 (ver Figura R12).

Estos datos en conjunto apoyarían que, en células en interfase, los cuatro factores considerados tradicionalmente reclutadores de γ TuRCs (AKAP450, PCNT, CDK5Rap2 y miomegalina) y, por tanto, responsables de la nucleación de MTs, serían prescindibles para que dicho proceso ocurra en el centrosoma. Estos resultados no descartan, sin embargo, el papel esencial que dichas proteínas podrían jugar durante la mitosis, como se ha descrito en varios artículos previos.

2.1.1.3. Otras proteínas reclutadoras de γ TuRCs: Papel de CEP192

El hecho de que los principales factores reclutadores de γ TuRCs al centrosoma no parecieran importantes para la nucleación de MTs, nos obligó a mover el foco hacia otras proteínas que también habían demostrado su capacidad de reclutar γ TuRCs o incluso de formar parte del mismo. Este era el caso de la proteína centrosómica CEP192.

La aproximación inicial fue seguir el mismo procedimiento empleado para las otras tres proteínas, es decir, obtener una línea *cep192* KO por medio de la tecnología CRISPR/Cas9 y posteriormente analizar el comportamiento de ésta. Sin embargo, aunque fuimos capaces de observar células que carecían de marcaje para CEP192 en los primeros días tras la transfección (ver Materiales y Métodos), no fuimos capaces de aislar una línea celular estable *cep192* KO tras varios intentos con diferentes parejas de ARNs guías. Por ello, decidimos inhibir de forma transitoria la expresión de la proteína mediante experimentos clásicos de ARN de interferencia (siRNA).

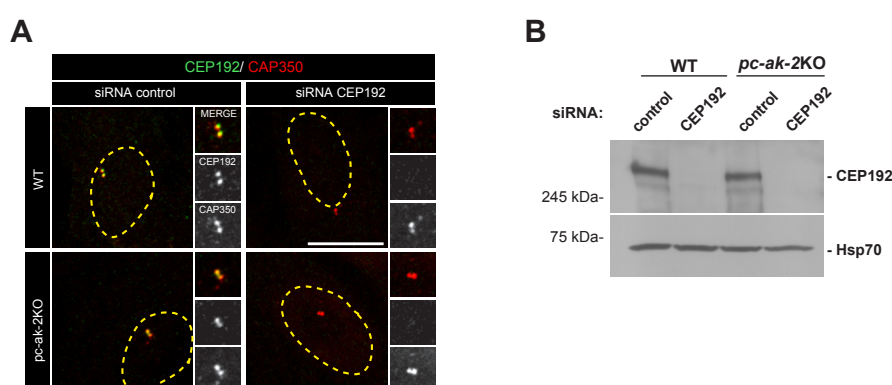


Figura R13. Caracterización de la eficiencia del siRNA de CEP192. (A) Células RPE1 WT y *pcnt/akap450* KO (*pc-ak-2KO*) fueron transfectadas con siRNA control y siRNA frente a CEP192 durante 72 horas. Después de su fijación, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-CEP192 (verde) y anti-CAP350 (rojo, como marcador de centrosoma). Recuadros ampliados de los centrosomas se muestran en la parte derecha de cada imagen, exhibiendo en el panel inferior el marcaje simple de CAP350, el de CEP192 en el panel medio y el doble marcaje CEP192/CAP350 en el panel superior. Las líneas discontinuas amarillas indican el contorno del núcleo. (B) Extractos totales de células WT y *pcnt/akap450* KO transfectadas con siRNA control y siRNA CEP192 durante 72 horas fueron analizados por WB con anticuerpos anti-CEP192. Hsp70 se usó como control de carga. Barra de escala, 5 μ m.

Para ello, seleccionamos una mezcla de tres siRNAs ya descrita en la bibliografía (O'Rourke et al. 2014) y que permitía la inhibición de la expresión de todas las isoformas descritas. La eficacia de los siRNAs resultó ser muy alta, ya que tanto en los experimentos de IF como en los ensayos de WB, los niveles de proteína se redujeron casi completamente y de forma masiva en el cultivo (Ver Figura R13).

Para analizar la contribución de CEP192 a la nucleación de MTs desde el centrosoma utilizamos las mismas aproximaciones que en el apartado anterior. A diferencia de los resultados obtenidos en las líneas celulares *akap450* KO, *cdk5rap2* KO, *pcnt* KO así como en las dobles mutantes *pcnt/akap450* KO y *pcnt/cdk5rap2* KO, el silenciamiento de CEP192 afectó a la dinámica de nucleación de MTs, tanto a nivel de número de cometas de EB1 como de la densidad del áster de MTs en ensayos de repolimerización tras tratamiento con NZ. La cuantificación de tales experimentos reveló una reducción de los valores del 27 y 30 % respectivamente, en comparación con las células WT (Figura R14).

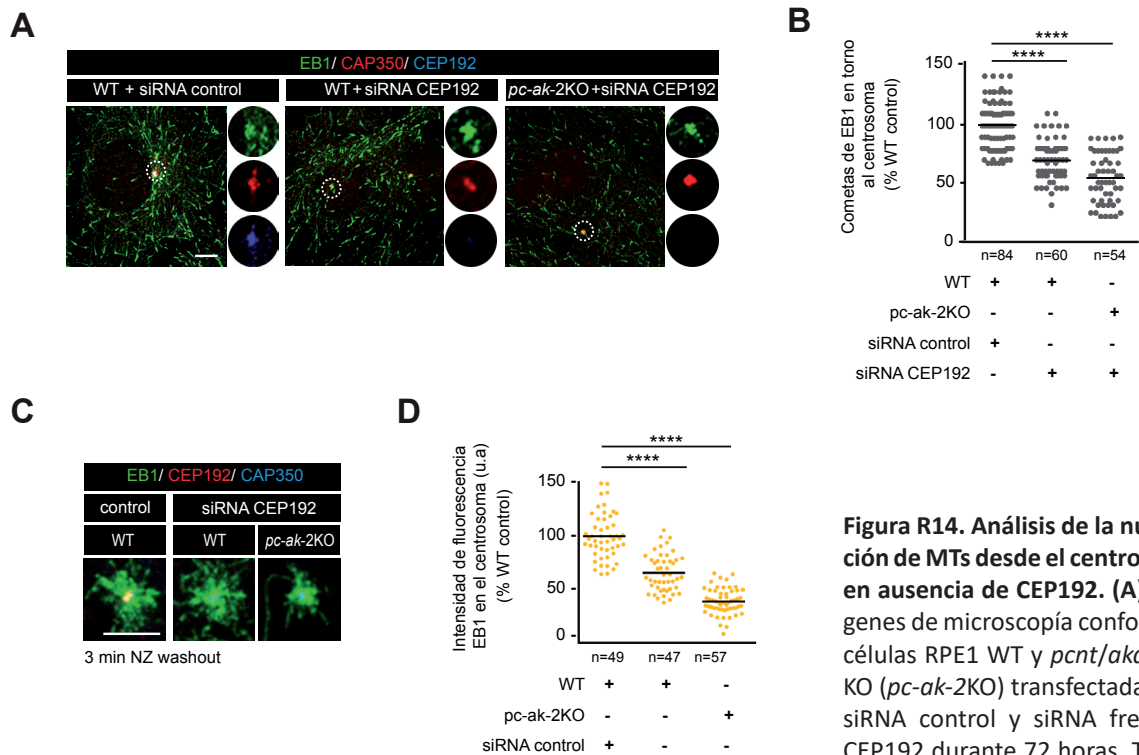


Figura R14. Análisis de la nucleación de MTs desde el centrosoma en ausencia de CEP192. (A) Imágenes de microscopía confocal de células RPE1 WT y *pcnt/akap450* KO (*pc-ak-2KO*) transfectadas con siRNA control y siRNA frente a CEP192 durante 72 horas. Tras la fijación, las células fueron marca-

das con anticuerpos anti-EB1 (verde), anti-CAP350 (rojo) y anti-CEP192 (azul). A la derecha se observan ampliificaciones de las áreas seleccionadas, mostrándose los canales individuales por separado. **(B)** Cuantificación del número de cometas de EB1 presentes alrededor del centrosoma de tres experimentos independientes como los mostrados en (A). Se determinó una región de interés de 3 μ m de radio entorno a la señal de CAP350 y se empleó para cuantificar el número de cometas de EB1 existentes en dicho área. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT transfectadas con el siRNA control. **(C)** Células RPE1 WT y *pcnt/akap450* KO transfectadas con siRNA control y siRNA CEP192 durante 72 horas fueron incubadas con NZ (10 μ M) durante 3 horas y posteriormente reincubadas a 37°C durante 3 minutos en medio fresco tras el lavado de la droga. Después de su fijación, las células fueron teñidas con anti-EB1 (verde) y anti-CEP192 y anti-CAP350 (azul). Los recuadros muestran la región del centrosoma ampliificada. **(D)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de EB1 alrededor del centrosoma de tres experimentos independientes como los mostrados en (C). Los valores están normalizados con respecto a la media de los valores obtenidos para las células WT transfectadas con el siRNA control.

Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA seguida de un test de Dunnett's. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; n.s. = no significativo. Barra de escala, 5 μ m.

Nos preguntamos entonces cómo afectaría la ausencia CEP192 a la nucleación de MTs desde el centrosoma en las células doble mutante PCNT/AKAP450 que prácticamente carecen de los cuatro reclutadores convencionales de γ TURCs. En tales condiciones la inhibición de la expresión de CEP192 provocó un descenso más pronunciado en la nucleación de MTs desde el centrosoma, observándose una disminución del 41.2 % en el número de cometas de EB1 (Figura R14A y R14B) y de hasta un 59.3% en la densidad de MTs del áster tras el lavado de NZ (Figura R14C y R14D). Estos resultados revelan que i) CEP192 juega un papel más relevante en la nucleación de MTs desde el centrosoma que los cuatro reclutadores convencionales de complejos γ TURC; ii) que existen mecanismos de compensación entre las dos vías puesto que el efecto es más acentuado cuando se elimina CEP192 en un contexto de falta de los demás factores, y iii) que hay mecanismos adicionales que operan cuando ninguna de estas proteínas están presentes y que son responsables de casi el 40% de la nucleación total de MTs desde el centrosoma.

2.1.2. Papel de los factores de unión a γ TURCs en el AG.

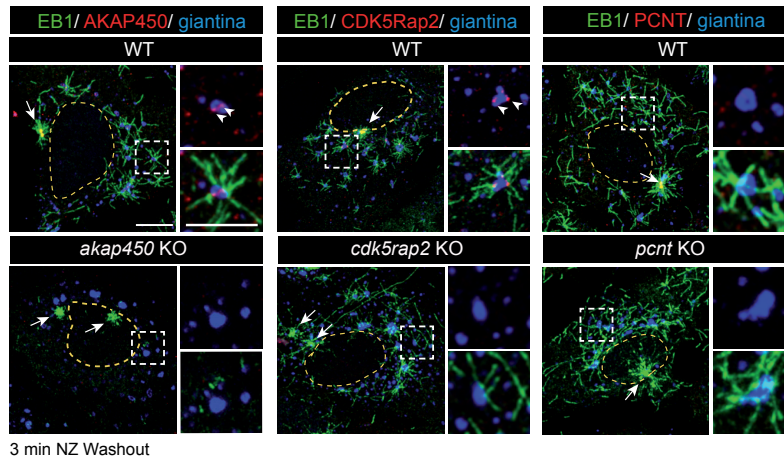
Paralelamente al análisis que acabamos de describir en el centrosoma, llevamos a cabo un examen similar sobre la nucleación de MTs desde el AG. En este caso, ya sabíamos que la ausencia de AKAP450 inhibe la nucleación por completo pero cuál era el papel del resto de proteínas era una incógnita aún.

Este análisis se llevó a cabo mediante experimentos de repolimerización tras tratamiento con NZ que, como ya se ha mencionado, fragmenta el AG y lo dispersa por el citoplasma. Esto permite la cuantificación de la nucleación de MTs a partir de pequeños elementos de membrana aislados, procedimiento mucho menos complejo que hacerlo desde un orgánulo grande, morfológicamente complicado y que rodea el centrosoma. Para determinar la cantidad de MTs nucleados por el conjunto de fragmentos de Golgi en cada célula, usamos un método recientemente descrito (Wu et al. 2016) que consistía en tomar imágenes de microscopía confocal tras tiempos cortos de repolimerización y cuantificar la intensidad de colocalización entre el marcaje de las membranas de Golgi y el de EB1, aprovechando el hecho de que EB1 cubre la longitud de los MTs recién nucleados. Para ello utilizamos el software de MetaMorph (ver Materiales y Métodos para más detalles). Este método, además de sencillo, tiene la ventaja de eliminar la variabilidad técnica entre diferentes experimentos pues es el número y no la longitud de los MT el parámetro que participa en la cuantificación.

Los resultados de esta cuantificación mostraron un descenso moderado de la nucleación (27%) de MTs desde el AG en el caso de las células *cdk5rap2* KO en comparación con las WT, en concordancia con lo que había sido recientemente publicado (Wu et al. 2016) (Figura R15). Curiosamente, la ausencia de PCNT en las células produjo el efecto contrario detectándose un incremento del 43% con respecto a las células controles (Figura R15). Este último dato resulta aún más sorprendente teniendo en cuenta que a diferencia de AKAP450 y CDK5RAP2, PCNT no se localiza aparentemente en el AG en la mayoría de tipos celulares examinados. En resumen, estos resultados indican que, la nucleación de MTs desde el AG es estrictamente dependiente de AKAP450 (tal y como ya se había descrito), mientras que tanto CDK5Rap2 como PCNT podrían actuar como moduladores o reguladores, estimulándola en el caso de CDK5Rap2 y frenándola en el de PCNT.

Globalmente, estos datos demuestran que, en interfase, las principales proteínas reclutadoras de γ TURCs participan en la nucleación de MTs asociada al AG mientras que sólo contribuyen ligeramente a la nucleación asociada al centrosoma la cual parece más dependiente de CEP192 así como de otros mecanismos adicionales aún por caracterizar.

A



B

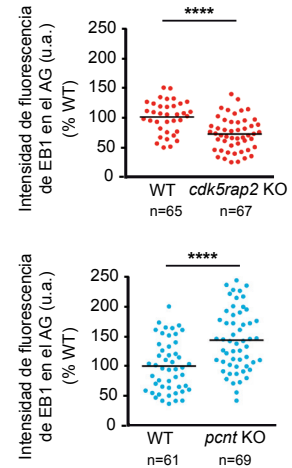


Figura R15. Análisis de la influencia de AKAP450, CDK5Rap2 y pericentrina en la nucleación de MTs desde el AG. (A) Células RPE1 WT, *akap450* KO, *cdk5rap2* KO o *pcnt* KO fueron incubadas con NZ (10 μ M) durante 3 horas y posteriormente reincubadas a 37°C durante 3 minutos en medio fresco tras el lavado de la droga. Después de su fijación, las células fueron teñidas con anti-EB1 (verde), anti-AKAP450, anti-CDK5Rap2 o anti-PCNT (rojo) respectivamente y anti-Giantina (azul). Los recuadros se encuentran ampliados en la parte derecha de cada imagen mostrándose en cada panel superior el doble marcaje rojo (AKAP450, CDK5Rap2 o PCNT) y azul (giantina) y en cada panel inferior el triple marcaje incluyendo EB1. Las flechas señalan los centrosomas y las puntas de flechas muestran la presencia de la proteína en cuestión sobre el marcaje del AG (giantina). La línea amarilla discontinua marca el contorno del núcleo. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de EB1 que colocaliza con el marcaje del AG de tres experimentos independientes como los mostrados en (A) para células RPE1 WT, *cdkrap2* KO y *pcnt* KO. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Barra de escala, 5 μ m.

2.2. Distribución intracelular de los distintos complejos reclutadores de γ TURCs.

Una vez evaluada la participación de los distintos factores reclutadores de γ TURCs en la nucleación de MTs, quisimos profundizar en los mecanismos moleculares que la sustentan identificando los complejos proteicos en que se organizan. Para ello realizamos experimentos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos frente a cada una de las proteínas de interés a partir de fracciones solubles de extractos de células silvestres. Tal como se muestra en la figura R16, tanto CDK5Rap2 como γ -tubulina coinmunoprecipitan con AKAP450. Similares resultados se obtuvieron cuando se inmunoprecipitó PCNT. Por el contrario, no fuimos capaces de co-inmunoprecipitar AKAP450 con PCNT en ninguno de los dos sentidos (Figura R16), en discrepancia con los resultados descritos en células HeLa (Takahashi et al. 2002). Estos resultados apuntan la existencia de dos tipos de complejos de proteínas de unión a γ TURCs que pueden ser aislados del citoplasma de las células: uno formado por PCNT-CDK5Rap2- γ -tubulina y otro por AKAP450-CDK5Rap2- γ -tubulina.

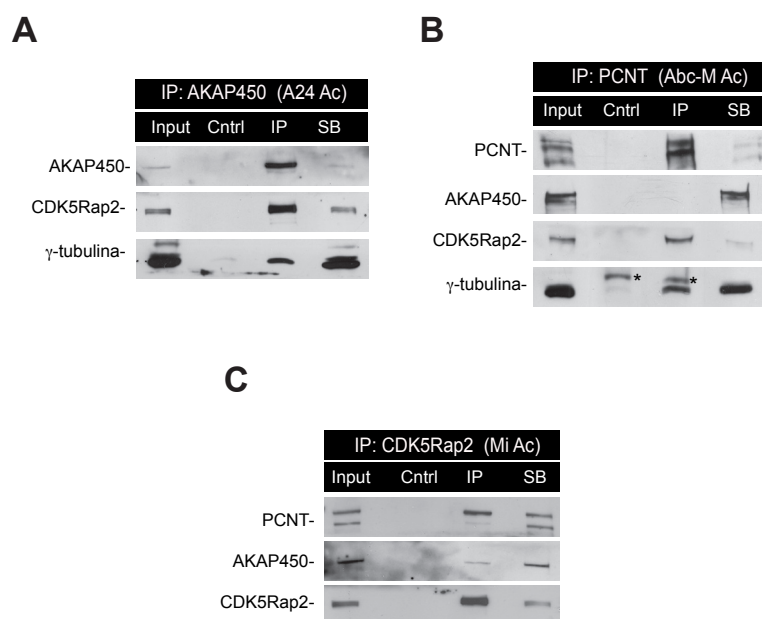


Figura R16. Análisis bioquímico de los complejos proteicos formados por AKAP450, CDK5Rap2, pericentrina y γ-tubulina. (A-C) Inmunoprecipitación de extractos totales de células RPE1 WT usando el anticuerpo anti-AKAP450 (A24) (A), anti-PCNT (Abc-M) (B) y anti-CDK5Rap2 (Mi) (C). Los inmunoprecipitados fueron posteriormente examinados mediante WB para detectar la presencia de AKAP450, PCNT, CDK5Rap2 y γ-tubulina tal como se indica. En todos los casos se muestra el extracto celular utilizado (Input), el inmunoprecipitado con Igs no específicas (Cntrl), el inmunoprecipitado con la Ig específica (IP) y el sobrenadante no unido (SB). Los * indican las cadenas pesadas de inmunoglobulina.

2.2.1. Dinámica de los complejos en el centrosoma

El análisis de la distribución celular de los complejos que habíamos identificado en las diferentes líneas celulares knock-out se llevó a cabo mediante IF cuantitativa. Para ello, se determinó la intensidad de fluorescencia del marcaje obtenido con anticuerpos frente a cada una de las proteínas de interés en el centrosoma en relación con el de una proteína centrosómica, CAP350, que no debería, teóricamente, verse afectada por las mutaciones generadas. Estos experimentos se llevaron a cabo en células tratadas con NZ a fin de fragmentar el AG en pilas de cisternas dispersas por el citoplasma (Thyberg and Moskalewski 1999) permitiendo una identificación clara y precisa del *pool* centrosómico como ya mencionábamos arriba (ver Materiales y Métodos).

El análisis reveló que la ausencia de AKAP450 provocaba un incremento de PCNT en el centrosoma de aproximadamente 1,5 veces respecto a los valores presentes en las células silvestres (Figura R17A). La ausencia de PCNT daba lugar a un incremento muy similar en la intensidad de fluorescencia de AKAP450 en el centrosoma tanto en células *pcnt* KO como *pcnt/cdk5rap2* KO (Figura R17C y R17E). Estos resultados sugieren que AKAP450 y PCNT asocian con el centrosoma de manera independiente pero co-regulada dado que la ausencia de uno favorece la acumulación del otro. Puesto que ambas proteínas poseen el dominio *PACT* de unión al centrosoma, la explicación más sencilla para estos resultados es que ambas compiten por los sitios de unión a dicho dominio presentes en el PCM.

La inhibición de la expresión de CDK5Rap2 no parecía afectar a la interacción de AKAP450 y PCNT con el centrosoma lo que sugiere que esta proteína se encuentra aguas abajo respecto a las otras dos en los complejos de asociación al PCM (Figura R17B). En línea con esta idea, los niveles centrosómicos de CDK5Rap2 variaron en las líneas celulares mutantes de AKAP450 y PCNT (Figura R17A y R17C). Así, en las células *akap450* KO se apreció un incremento significativo de CDK5Rap2 en el centrosoma (aumento del 30%) en paralelo con el aumento de PCNT en tales condiciones, mientras que la pérdida

de PCNT daba lugar a una reducción de aproximadamente el 60% de la proteína con respecto a los valores silvestres acompañando el aumento de AKAP450. Cuando ambas proteínas se encontraban ausentes al mismo tiempo (células *pcnt/akap450* KO), el marcaje de CDK5Rap2 en el centrosoma era prácticamente indetectable (Figura R17D). Hay que recordar que en estas condiciones, los niveles de CDK5Rap2 se han reducido más de un 80% probablemente por degradación (ver Figura R10). Estos resultados apuntan a que el reclutamiento de CDK5Rap2 al centrosoma está mediado principalmente por PCNT.

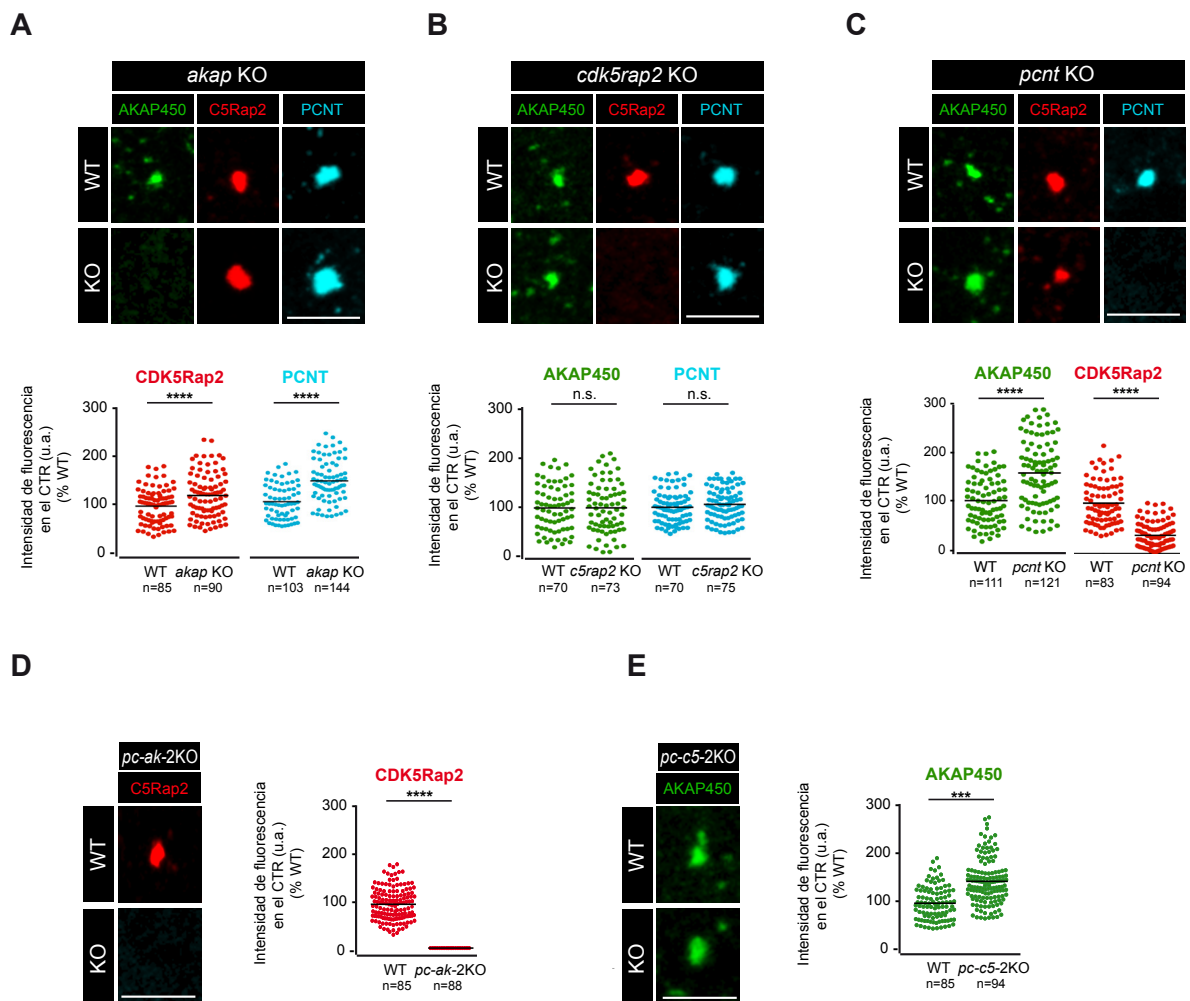


Figura R17. Distribución e interacción de AKAP450, CDK5Rap2 y pericentrina en el centrosoma. (A-E) (Parte superior) Células RPE1 WT, *akap450* KO (*akap* KO) (A), *cdk5rap2* KO (*c5rap2* KO) (B), *pcnt* KO (C), *pcnt/akap450* KO (*pc-ak-2*KO) (D) y *pcnt/cdk5rap2* KO (*pc-c5-2*KO) (E) fueron fijadas y marcadas con anticuerpos anti-AKAP450, anti-CDK5Rap2 y anti-PCNT. Los paneles muestran imágenes amplificadas de los centrosomas en cada caso. (Parte inferior) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de cada una de las proteínas de interés en el centrosoma. Se determinó una región de interés de 1.5 μ m de radio alrededor del centrosoma y se cuantificó la intensidad de señal existente en dicho área. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT y proceden de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; n.s.= no significativo. Barra de escala, 5 μ m.

Como todas estas proteínas han sido descritas como factores reclutadores de γ TURCs, quisimos evaluar cuál era el impacto de las alteraciones en sus niveles sobre la capacidad de reclutar γ -tubulina al centrosoma. Para ello, seguimos el mismo procedimiento anterior, pero determinando, en esta ocasión, la intensidad de fluorescencia de γ -tubulina en cada una de las condiciones.

En contra de lo esperado, la cantidad de γ -tubulina no se vio afectada en gran medida en ninguna de las condiciones analizadas ($\pm 20\%$ al alza o a la baja en los mutantes simples AKAP450 y PCNT, respectivamente) (Figura R18). Especialmente inesperada fue la ausencia de perturbaciones en los niveles de γ -tubulina en la línea doble mutante PCNT/AKAP450 que prácticamente carece de los cuatro factores reclutadores de γ TuRCs convencionales.

Estos resultados sugieren que estas proteínas contribuyen minoritariamente al reclutamiento de γ -tubulina al centrosoma durante la interfase y que podrían desencadenarse mecanismos compensatorios de reclutamiento cuando todas ellas están ausentes. Además, la falta de alteraciones importantes en los niveles de γ -tubulina en el centrosoma podría explicar la escasez de modificaciones relevantes en la nucleación de MTs descrita previamente (Figura R11 y R12).

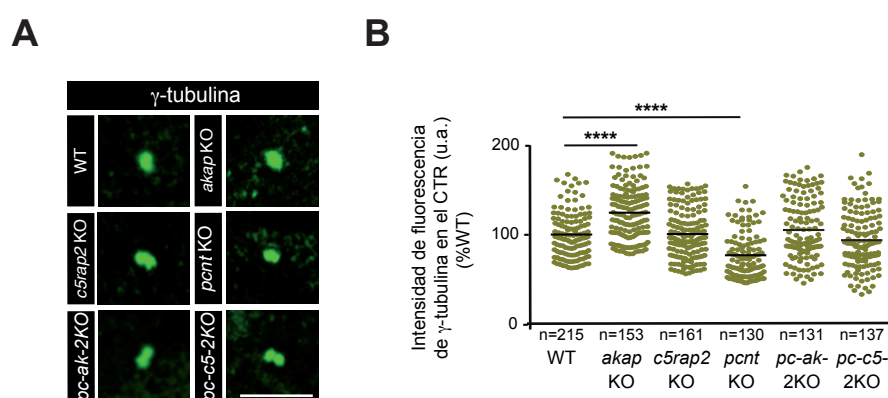


Figura R18. Reclutamiento de γ -tubulina al centrosoma en las distintas líneas knock-out (A) Células RPE1 WT, *akap450* KO (*akap* KO), *cdk5rap2* KO (*c5rap2* KO), *pcnt* KO, *pcnt/akap450* KO (*pc-ak-2KO*) y *pcnt/cdk5rap2* KO (*pc-c5-2KO*) fueron fijadas y marcadas con anticuerpo anti- γ -tubulina. Los

paneles muestran imágenes amplificadas de los centrosomas en cada caso. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de γ -tubulina en el centrosoma. Se determinó una región de interés de $1.5 \mu\text{m}$ de radio alrededor del centrosoma y se cuantificó la intensidad de señal existente en dicha área. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT y proceden de 3 experimentos independientes.

Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA seguida de un test de Dunnett's. **** $p < 0.0001$. Barra de escala, $5 \mu\text{m}$.

El siguiente paso fue valorar el impacto de otros factores reclutadores de γ TURCs como CEP192. Siguiendo la estrategia ya empleada anteriormente, realizamos una inhibición transitoria de la expresión de CEP192 mediante siRNA lo que provocó una reducción del 38% de los niveles centrosómicos de γ -tubulina. La disminución se elevó hasta el 54% cuando los experimentos de siRNA se realizaron sobre la línea celular doble mutante *pcnt/akap450* KO (Figura R19).

Todos estos datos en conjunto apuntan a que i) CEP192 responde de alrededor del 40% de la actividad de reclutamiento de γ TURCs, y en paralelo del 40% de la actividad de nucleación de MTs en el centrosoma; ii) que las proteínas consideradas tradicionalmente reclutadoras de γ TURCs sólo

son responsables de un 10-15% de ambas actividades, iii) que factores adicionales o mecanismos alternativos deben responder del 50% de actividad de nucleación de MTs en el centrosoma durante la interfase.

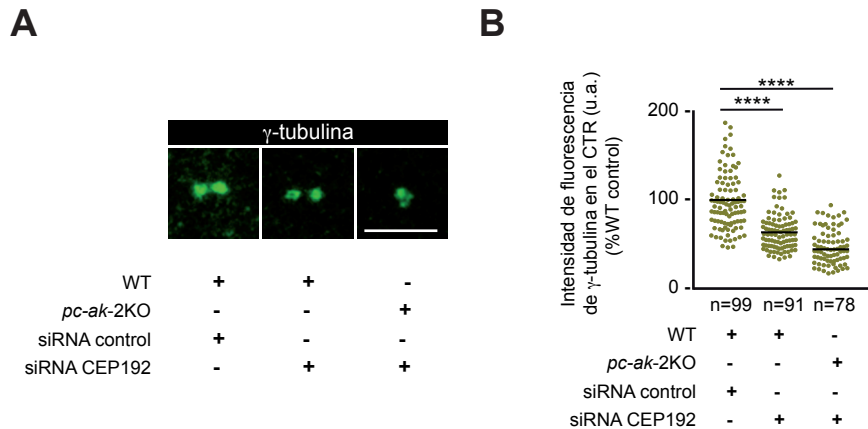


Figura R19. Papel de CEP192 en el reclutamiento de γ -tubulina al centrosoma. (A) Imágenes de microscopía confocal de células RPE1 WT y *pcnt/akap450* KO (*pc-ak-2KO*) transfectadas con siRNA control y siRNA frente a CEP192 durante 72 horas. Tras la fijación, las células fueron marcadas con anticuerpo anti- γ -tubulina. Los paneles muestran imágenes amplificadas de los centrosomas en cada caso.

(B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de γ -tubulina en el centrosoma. Se determinó una región de interés de 1.5 μ m de radio alrededor del centrosoma y se cuantificó la intensidad de señal existente en dicha área. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT y proceden de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA seguida de un test de Dunnett's. ****p<0.0001. Barra de escala, 5 μ m.

2.2.2. Dinámica de los complejos en el AG

Contrariamente a lo que ocurre con el centrosoma, la nucleación de MTs desde el AG se modificó sustancialmente cuando se perturbaron los niveles de las proteínas bajo estudio (ver Figura R15). Nos propusimos, por tanto, estudiar la distribución de los complejos previamente descritos en este orgánulo. Nuevamente, usamos un tratamiento con NZ para fragmentar el AG y poder distinguir éste del marcaje del centrosoma. Como parámetro para evaluar el reclutamiento de las distintas proteínas a las membranas del AG determinamos co-localización de la fluorescencia emitida por anticuerpos frente a AKAP450, CDK5Rap2 o PCNT con la de un anticuerpo frente a una proteína de la cara *cis* del AG (GMAP210).

En primer lugar, los resultados obtenidos en las líneas mutantes confirmaron datos previos de la localización de AKAP450 y CDK5Rap2 en el AG siendo el reclutamiento de ésta última dependiente de AKAP450 (Figura R10C). Por el contrario, y aunque se había descrito en células musculares, no se observó marcaje de PCNT asociado al AG a pesar de apreciarse una nube de puntos en torno al mismo (Figura R20A). Sorprendentemente, en las células carentes de PCNT, se detectó un aumento significativo en el marcaje de AKAP450 y CDK5Rap2 en el Golgi, siendo especialmente notable en este último caso al observarse un aumento de aproximadamente un 40% de señal (Figura R20B). Estos datos podrían explicar el incremento de nucleación de MTs desde el AG que previamente habíamos puesto de manifiesto en esta línea celular (ver Figura R15). Por su parte, las células *cdk5rap2* KO no

presentaron alteraciones significativas en el marcaje de ninguna de las proteínas analizadas en el AG (Figura R20C).

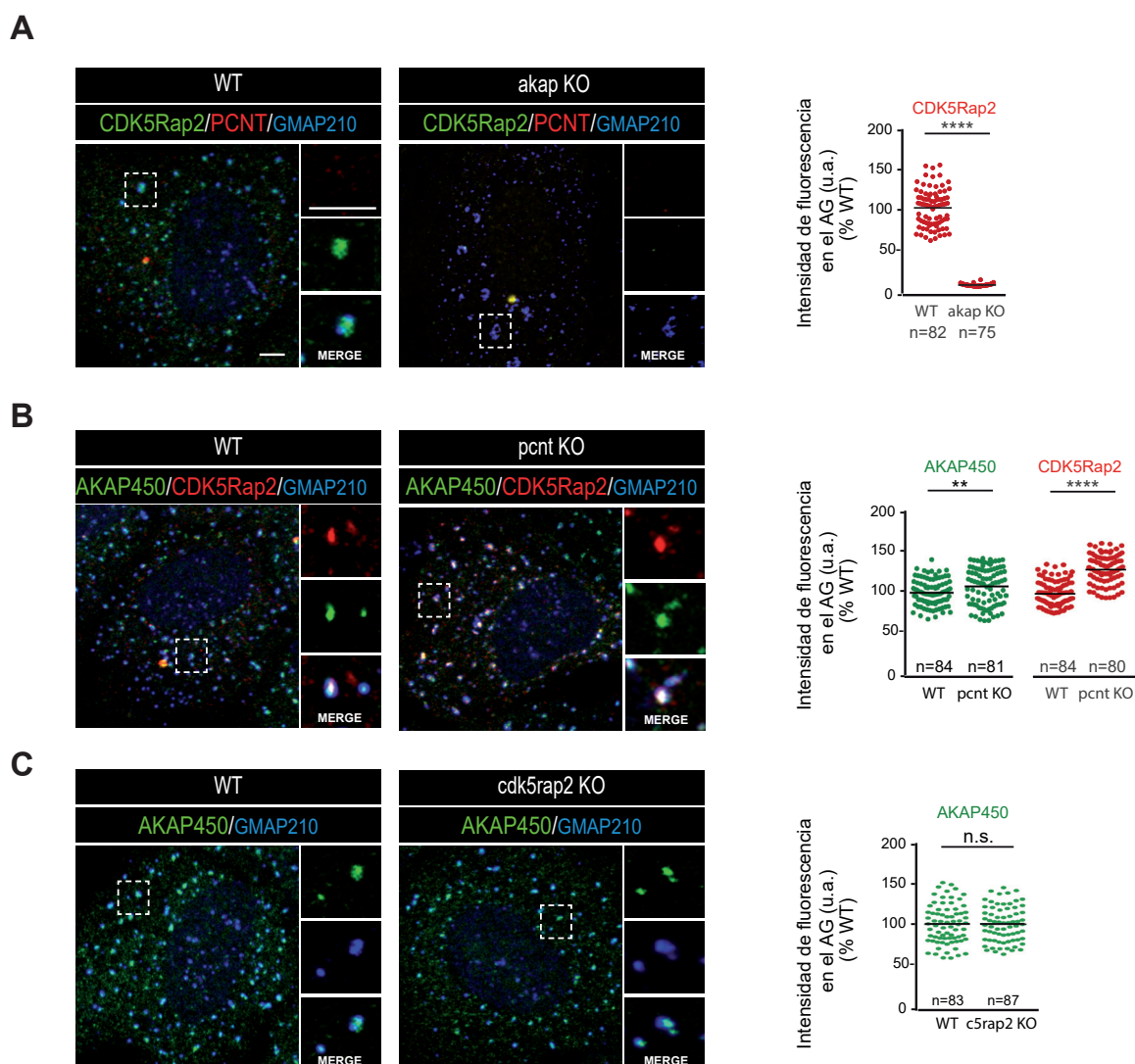


Figura R20. Distribución e interacción de AKAP450, CDK5Rap2 y pericentrina en el AG. (A-C) Células RPE1 WT, *akap450* KO (*akap* KO), *cdk5rap2* KO y *pcnt* KO incubadas durante 3 horas en medio con NZ (10 μ M) fueron fijadas y teñidas para su análisis por IF. (A, izquierda) Se observa un triple marcaje con el anticuerpo anti-CDK5Rap2 (verde), anti-PCNT (rojo) y anti-GMAP210 (azul) en células RPE1 WT y *akap* KO. (B, izquierda) Se muestra un triple marcaje con anti-AKAP450 (verde), anti-CDK5Rap2 (rojo) y anti-GMAP210 (azul) en células RPE1 WT y *pcnt* KO. (C, izquierda) Se observa un doble marcaje con el anticuerpo anti-AKAP450 (verde) y anti-GMAP210 (azul) en células RPE1 WT y *cdk5rap2* KO. Los recuadros se muestran ampliados a la derecha de cada imagen con los diferentes marcadores por separado y la imagen superpuesta (señalada como MERGE). (A-C, derecha) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de CDK5Rap2 (en el caso de *akap* KO), AKAP450 y CDK5Rap2 (en el caso de *pcnt* KO) o AKAP450 (en el caso de *cdk5rap2* KO) que colocaliza con el marcador de Golgi GMAP210. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT y proceden de 3 experimentos independientes. (Ver Materiales y Métodos para más información).

Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student. ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; n.s.= no significativo. Barra de escala, 5 μ m.

De los resultados expuestos en este capítulo podemos concluir que las proteínas reclutadoras de γ TuRCs convencionales conforman dos tipos de complejos proteicos: aquellos que contienen AKAP450-CDK5Rap2 (complejos basados en AKAP450) que se hallarían presentes tanto en el centrosoma como en el AG y aquellos formados por PCNT-CDK5Rap2 (complejos basados en PCNT) que específicamente se localizan en el centrosoma, estando ambos presentes en el citoplasma celular (ver Figura R21).

En el centrosoma, la eliminación de AKAP450 provoca un incremento en los niveles de PCNT (Figura R17) en paralelo con un incremento ligero de la señal de γ -tubulina en el mismo (Figura R18). La ausencia de PCNT, por su parte, genera un descenso en los niveles de γ -tubulina a pesar del incremento de los niveles de AKAP450 (Figuras R17 y R18) indicando que el papel de PCNT en el reclutamiento de γ TuRCs al centrosoma es más relevante que el de AKAP450. En cualquier caso, estas variaciones son poco significativas con respecto a las producidas por alteraciones en el nivel de CEP192 y de otros factores aun por caracterizar.

En el AG, la pérdida de PCNT también estimula el reclutamiento de CDK5Rap2 al AG (Figura 20B) lo que se interpreta como un incremento de las interacciones AKAP450-CDK5Rap2 que podría explicar el aumento que se observa en la nucleación de MTs desde este MTOC en las células *pcnt* KO (Figura R15).

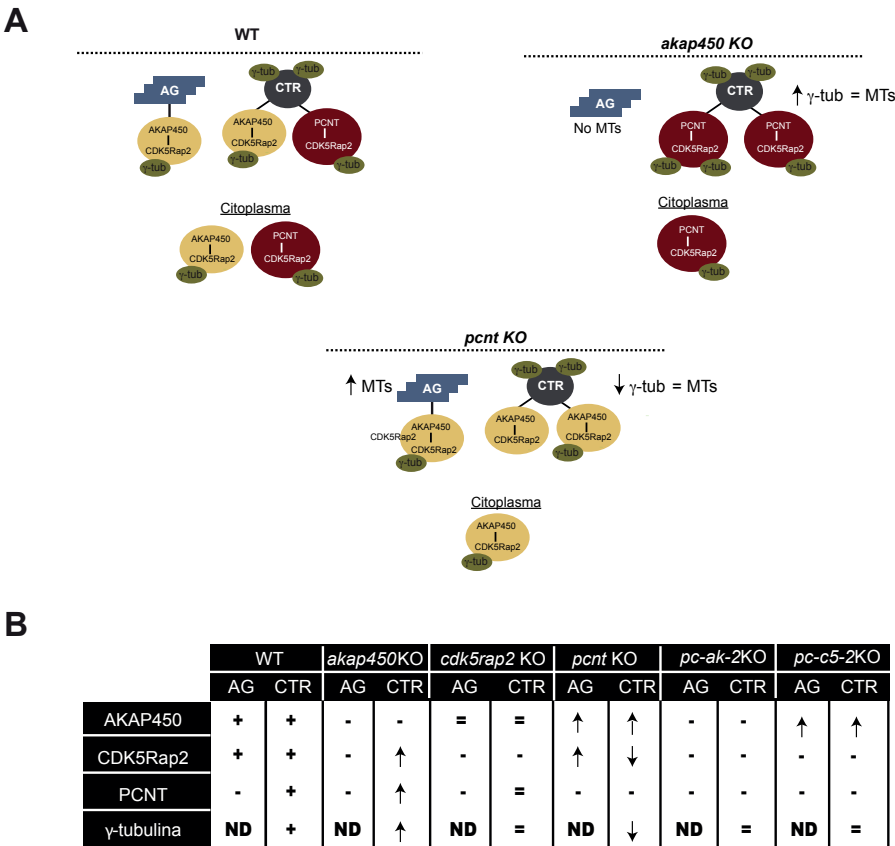


Figura R21. Distribución de los complejos reclutadores de γ TuRC. (A) Esquema representativo de la distribución de los complejos reclutadores de γ TuRC basados en AKAP450 y PCNT observados en células RPE1 WT, *akap450* KO y *pcnt* KO y su capacidad de reclutar γ -tubulina (γ -tub). **(B)** Tabla resumen de la distribución de AKAP450, CDK5Rap2, PCNT y γ -tubulina en los dos principales MTOCs observada en todas las líneas celulares generadas. AG= Aparato de Golgi; CTR=centrosoma; (+)= está presente; (-)= no está presente; (↑)= se incrementa; (↓)= disminuye; ND= no hay datos. (*pc-ak-2*KO = *pcnt/akap450* KO; *pc-c5-2*KO = *pcnt/cdk5rap2* KO).

CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE LA AUSENCIA DEL CENTROSOMA EN LA ACTIVIDAD DE OTROS MTOCs.

En este capítulo expondremos los resultados obtenidos en los experimentos encaminados a dilucidar la regulación coordinada de la nucleación de MTs desde el centrosoma y el AG. La idea directriz es tratar de inhibir la nucleación en uno de ellos y analizar su repercusión en el otro y viceversa. Mientras que la estrategia de eliminar los principales factores reclutadores de γ TURCs resultó exitosa a la hora de inhibir la nucleación de MTs desde el AG, no encontramos condiciones experimentales que nos permitiesen bloquear, o ni siquiera reducir significativamente, la nucleación de MTs desde el centrosoma (solo conseguimos una reducción del 50% en el mejor de los casos). Nos vimos obligados a seguir una estrategia diferente, basada en el uso de la droga centrinona.

3.1. Papel del centrosoma en la nucleación de MTs desde el AG.

Para determinar el papel del centrosoma en la actividad nucleadora del AG decidimos emplear centrinona, un inhibidor reversible de la quinasa PLK4 que permite generar células sin centrosoma (ver Introducción). En condiciones normales, el centrosoma se duplica una vez cada ciclo celular de modo que, al completar la mitosis, las dos células hijas heredarán un centrosoma completo. Este proceso de duplicación de los centriolos es dependiente de la quinasa PLK4. El tratamiento de las células con centrinona bloquea la duplicación de los centriolos de forma que, tras varias divisiones en presencia de la droga, obtenemos un alto porcentaje de células sin ningún centriolo (Wong et al. 2015) (ver Figura R22A).

Aunque la centrinona ya había sido usada en células hTERT-RPE-1 en el artículo original (Wong et al. 2015), quisimos confirmar en primer lugar tanto la dosis en nuestras propias células como la ventana de tiempo más adecuada a nuestros experimentos. Para ello, realizamos diferentes ensayos variando tanto la concentración como el tiempo de exposición a la droga. Tras cinco días de tratamiento a una concentración de 125 nM, aproximadamente el 75-80% de las células ya carecían de centrosoma y apenas se apreciaban divisiones en el cultivo, llegándose a un 85-90% de células sin centrosoma a los 7 días. A partir de éste, el porcentaje de células sin centrosoma no se veía incrementado pero si se observaban células muy aberrantes y apoptóticas, por lo que consideramos que el periodo de 5-7 días era la franja de tiempo adecuada para la realización de los experimentos (ver Figura R22B)

El análisis de la actividad nucleadora de MTs del AG de las células sin centrosoma se hizo, nuevamente, usando ensayos de repolimerización de MTs tras un tratamiento con NZ. Bajo estas condiciones, prácticamente la totalidad de los MTs en la célula estaban creciendo en forma de ásteres desde los fragmentos del AG (Figura R23A).

Para cuantificar la actividad nucleadora del AG tras la pérdida del centrosoma diseñamos un software específico en colaboración con la empresa WIMASIS. Partiendo de imágenes obtenidas en el microscopio confocal con un doble marcaje para visualizar membranas del AG (rojo) y MTs (verde), el software era capaz de identificar de manera automática los elementos individuales de Golgi y los MTs que crecían desde cada uno de dichos elementos (Ver Figura R23B y Materiales y Métodos para detalles).

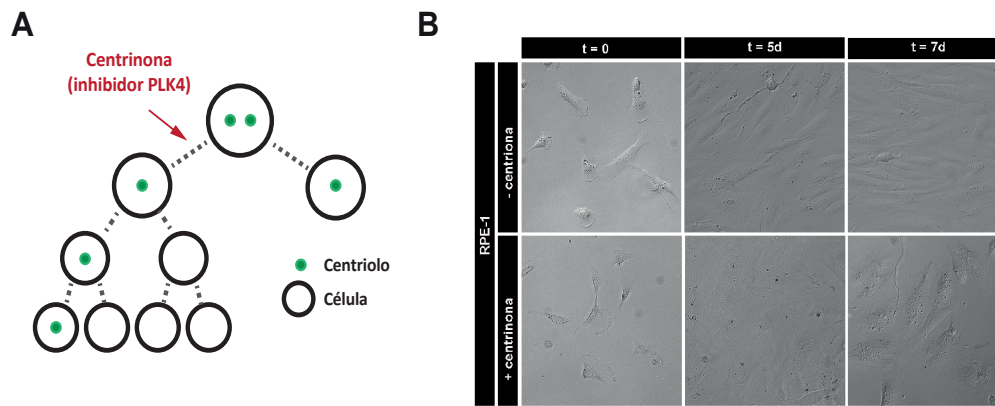


Figura R22. Tras 7 días de tratamiento con centrirona 125 nM las células RPE1 dejan de dividirse, observándose en el cultivo células aberrantes y apoptóticas. (A) Representación esquemática de la pérdida progresiva de centriolos como consecuencia de la inhibición de PLK4 por el uso de centrirona. Tras varios ciclos de división se obtiene una población de células sin centriolos. (B) Imágenes del cultivo de células RPE1 WT o tratadas con centrirona (125 nM) tras 5-7 días según se indica en cada caso. A partir del quinto día apenas se observan divisiones en el cultivo y desde el séptimo en adelante el porcentaje de células apoptóticas y aberrantes se incrementaba notablemente.

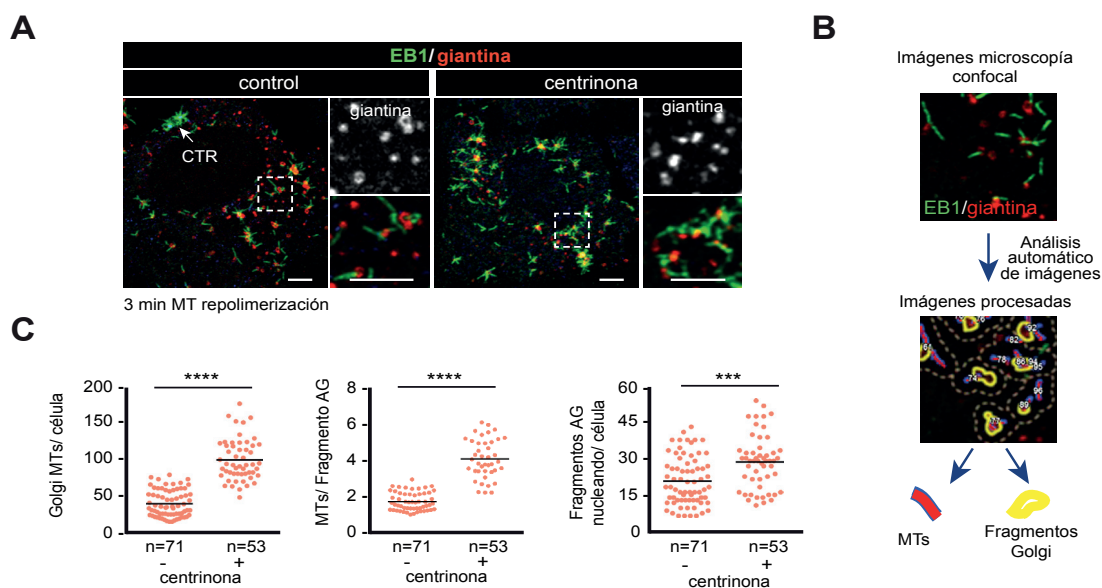


Figura R23. La ausencia de centrosoma provoca un incremento en la nucleación de MTs desde el AG. (A) Células RPE1 WT controles y tratadas con centrirona (125 nM, 5 días) fueron incubadas durante 3 horas en medio con NZ (10 μ M) y posteriormente reincubadas a 37°C durante 3 minutos. Después de su fijación, las células fueron teñidas con anticuerpos anti-EB1 (verde) y anti-Giantina (rojo). Los recuadros se muestran ampliados a la derecha de cada imagen; mostrando el panel superior el marcaje simple de giantina y el inferior el doble marcaje EB1 y giantina. La flecha apunta al centrosoma (CTR). (B) Representación esquemática del protocolo de trabajo empleado para la cuantificación de la nucleación de MTs desde el AG. Ver Materiales y Métodos para más detalles. (C) Cuantificación del número total de MTs creciendo desde el AG por célula (izquierda), del número de MTs siendo nucleados por fragmento de Golgi (centro), y del número de fragmentos de Golgi capaces de nuclear MTs por célula (derecha) obtenidos de experimentos en células RPE1 WT controles y tratadas con centrirona como se descrito en (A). Cada punto del gráfico representa un dato individual. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores.

Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Barra de escala, 5 μ m.

La cuantificación de más de 50 células controles y otras 50 tratadas con centrinona (células sin centrosoma) reveló un incremento de 3 veces en el número de MTs nucleados desde el AG por célula (42,7 MTs de media en las células controles frente a los 118,6 observados en las células carentes de centrosoma). Un análisis más detallado de los resultados mostró que este incremento en la nucleación de MTs asociada al AG en las células tratadas con centrinona, no sólo se debía a un incremento en el número de MTs que nuclean desde cada elemento individual de Golgi (1,9 MTs en las células controles frente a los 3,7 presentes en las células sin centrosoma), sino que también se apreciaba un aumento significativo de aproximadamente 1,3 veces en el número de elementos de Golgi por célula capaces de nuclear MTs pasando de una media de 24,3 en las células controles a 31,6 en aquellas tratadas con centrinona (ver Figura 23C).

Para descartar que el fenotipo se debiera a la inhibición de PLK4 en sí misma, y no a la ausencia del centrosoma, realizamos experimentos similares de repolimerización de MTs en células que habían sido tratadas con centrinona durante 3 horas (tiempos cortos) o 12 horas (tiempos largos), inferior en cualquier caso a la duración de un ciclo celular y que, por tanto, contenían un número normal de centriolos. En tales condiciones, el tratamiento con centrinona, y por tanto la inhibición de PLK4, no produjo diferencias significativas en la nucleación de MTs desde el AG con respecto a las células controles confirmando que el incremento observado en la actividad nucleadora del AG en las células tratadas con centrinona era una consecuencia directa de la pérdida del centrosoma (Ver Figura R24)

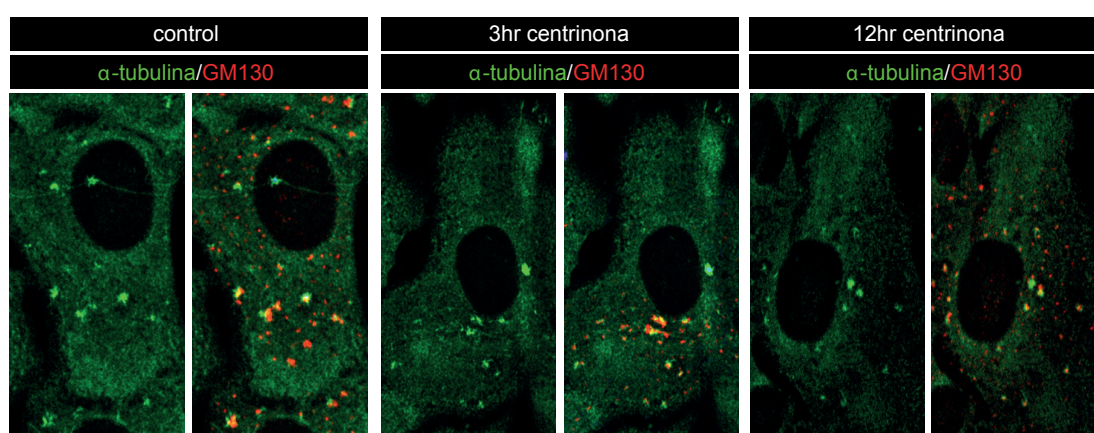


Figura R24. La inhibición de PLK4 en sí no modifica la capacidad del AG para nuclear MTs. Células RPE1 WT controles (sin tratamiento) y tratadas con centrinona (125 nM) durante 3 o 12 horas fueron incubadas con NZ (10 μ M) durante 3 horas y posteriormente reincubadas a 37°C durante 3 minutos. Después de la fijación, las células fueron marcadas con anticuerpos anti- α -tubulina (verde) y anti-GM130 (rojo). A la izquierda se muestra el marcaje simple de α -tubulina, mientras que a la derecha se observa el doble marcaje α -tubulina/GM130 para cada caso. Barra de escala, 7,5 μ m.

Para confirmar la validez del fenotipo en otros tipos celulares que también posean actividad de nucleación de MTs desde el AG, realizamos ensayos similares en células MCF10A (células de epitelio mamario no cancerosas). Tras el tratamiento con centrinona, procedimos a analizar la actividad nucleadora del AG, nuevamente mediante ensayos de repolimerización de MTs tras tratamiento con NZ. Bajo dichas condiciones, observamos que prácticamente la totalidad de los MTs crecían desde los

fragmentos del AG apreciándose igualmente un incremento de la capacidad nucleadora de éste en comparación con las condiciones control (ver Figura R25). Esto apoyaría que los mecanismos por los que la ausencia de centrosoma estimula la nucleación de MTs desde el Golgi parecen ser universales y no específicos de un tipo celular.

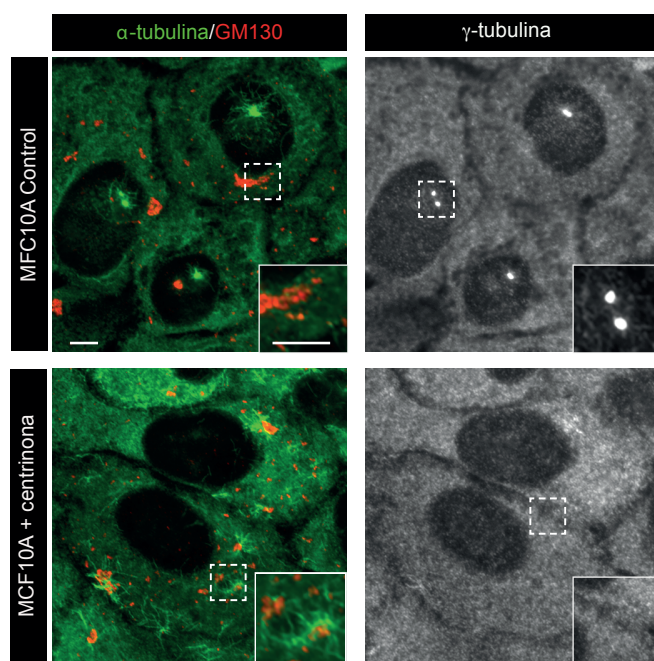


Figura R25. El efecto de la ausencia del centrosoma en la nucleación de MTs desde el AG es independiente del tipo celular. Células MCF10A controles (sin tratamiento, paneles superiores) y tratadas con centrinona (125 nM, 5 días; paneles inferiores) fueron incubadas con NZ (10 μ M) durante 3 horas y posteriormente reincubadas a 37°C durante 3 minutos. Después de la fijación, las células fueron marcadas con anticuerpos anti- α -tubulina, anti-Giantina y γ -tubulina. A la izquierda se muestra el doble marcaje α -tubulina (verde)/Giantina (rojo), mientras que a la derecha se observa el marcaje simple de γ -tubulina para indicar la presencia o ausencia de centrosoma. Los recuadros aparecen ampliados en la parte inferior derecha en cada caso, mostrando la nucleación de MTs desde el AG (paneles izquierda) o la presencia o ausencia de centrosoma (paneles derecha). Barras de escala, 5 μ m.

Razonamos entonces que si la capacidad de nucleación del AG aumenta en ausencia de centrosomas, un número extra de éstos MTOCs debería afectarla en sentido inverso. Para aclarar esta hipótesis, nos aprovechamos del hecho de que, al retirar la centrinona de las células, se produce una hiperactivación transitoria de PLK4, y como consecuencia, hay una oleada de formación de nuevos centriolos (Wong et al. 2015). En base a esto, tras 5-7 días de tratamiento con centrinona, procedimos a realizar un lavado de la droga y a analizar la capacidad de nucleación en ensayos de repolimerización de MTs. En tales condiciones, los centrosomas de nueva formación fueron capaces de reclutar γ -tubulina de manera significativa y presentaron una activa tasa de nucleación de MTs. Por el contrario, la capacidad del AG para reclutar γ -tubulina y nuclear MTs apareció notablemente mermada (Figura R26A).

Para cuantificar y caracterizar este fenotipo clasificamos las células tratadas en varias categorías: células con dos centriolos (condiciones control), células sin centriolos (tratadas con centrinona) y células con seis o con más de ocho centriolos (tras el lavado (*washout*) de centrinona), y determinamos el porcentaje de células en cada grupo en las cuales la nucleación de MTs desde el AG se encontraba totalmente inhibida. Los centriolos eran identificados gracias al marcaje positivo con un anticuerpo frente a la proteína centrosómica CEP63. Observamos que, en condiciones control, prácticamente todas las células presentaban nucleación de MTs desde el AG, valor que se incrementaba al 100% en el caso del tratamiento con centrinona (tal y como ya habíamos observado anteriormente). Sin embargo, al analizar las condiciones en las que las células presentaban centriolos extra, observamos

que aproximadamente el 57% de las células con seis centriolos no presentaban nucleación alguna de MTs desde el AG, valor que se incrementaba hasta el 63 % en el caso de células con más de 8 centriolos (Figura R26B). Aunque no venga reflejado en la gráfica, en aquellas células con más centriolos de la cuenta donde todavía se observaba nucleación de microtúbulos desde el AG, esta nucleación era mucho menor que la observada en células controles.

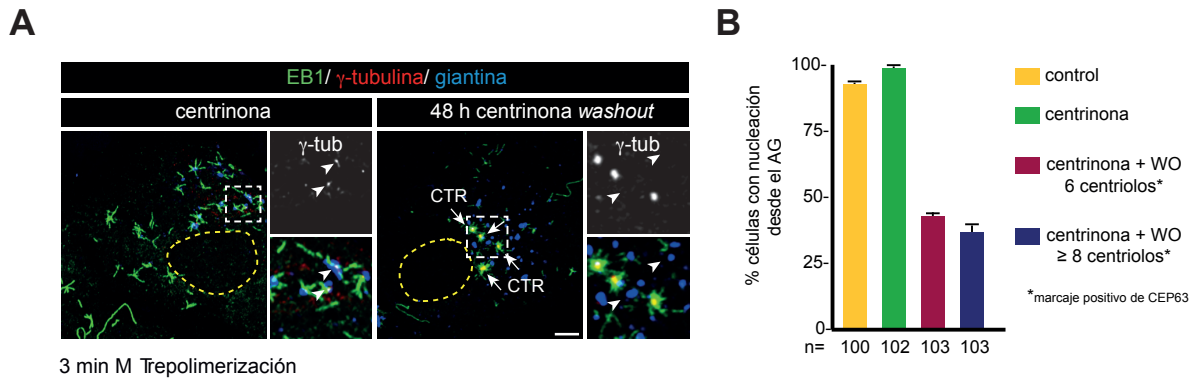


Figura R26. El número de centrosomas regula la nucleación de MTs desde el AG. (A) Células RPE1 WT tratadas con centrinona (125 nM) durante 7 días (izquierda) o durante 5 días para posteriormente mantener durante 48 horas más en ausencia de la droga (derecha). Tras este periodo, las células fueron incubadas durante 3 horas en NZ (10 μ M) y posteriormente reincubadas a 37°C durante 3 minutos con medio fresco. Después de su fijación, se realizó un marcaje con anticuerpos anti-EB1 (verde), anti- γ -tubulina (rojo) y anti-giantina (azul). Los recuadros muestran la nucleación de MTs desde elementos del AG (izquierda) o desde múltiples centriolos (derecha) y aparecen ampliados en la parte derecha de cada imagen observándose el marcaje simple de γ -tubulina en la parte superior y el triple marcaje EB1/ γ -tubulina/giantina en el panel inferior. Las líneas amarillas discontinuas marcan el contorno del núcleo. Las flechas apuntan al centrosoma (CTR) y las puntas de flechas indican la posición de los elementos Golgi. (γ -tub = γ -tubulina) **(B)** Cuantificación del porcentaje de células que presenta nucleación de MTs desde el AG obtenidas de experimentos como el indicado en (A). En el caso de las células tratadas con centrinona durante 5 días e incubadas 48 horas en ausencia de la misma; se crearon dos categorías en función del número de centriolos que se observaban con un marcaje de la proteína CEP63: 6 centriolos o ≥ 8 centriolos. Se analizaron al menos 100 células de dos experimentos diferentes para cada condición. Las barras representan los valores de la media \pm DE expresados en % de células. Barra de escala, 5 μ m.

Así, la presencia de un elevado número de centrosomas capaces de nuclear MTs provoca una drástica reducción de la capacidad nucleadora asociada al AG lo que indica que la actividad nucleadora de MTs desde el AG no sólo es dependiente de la existencia o no de centrosomas sino del número de éstos.

Estos resultados sugieren la existencia de una jerarquía en los MTOCs celulares donde el centrosoma sería el regulador principal dado que su número determina la capacidad de nucleación de MTs del AG mientras que la inhibición de la nucleación en el GA (eliminación de AKAP450) no afecta al centrosoma. Que la nucleación de MTs asociada al AG responda a alteraciones en el número de centrosomas podría ser relevante en cierto tipo de patologías, tales como el cáncer, en las que se desarrollan estas anomalías.

3.2. Reclutamiento de γ TuRCs al AG en ausencia del centrosoma.

Para profundizar en el mecanismo por el que la ausencia de centrosoma estimula la nucleación de MTs asociada al AG, procedimos a examinar la morfología e integridad de dicho orgánulo, así como la distribución de las principales proteínas reclutadoras de γ TuRCs (AKAP450, CDK5Rap2 y PCNT) a la superficie del mismo en células tratadas con centrinona.

En primer lugar, quisimos analizar si la ausencia de centrosoma afectaba de algún modo a la polaridad intrínseca de las cisternas que componen el AG, y que se dividen en cisternas de la cara *cis* (la más interna y próxima al retículo endoplásmico), medial y *trans* (la más externa y dirigida hacia la membrana plasmática). Para ello, realizamos ensayos de IF en células tratadas con centrinona usando GM130 como marcador de la cara *cis*, CTR433 como marcador de la región medial y Golgina 245 como marcador de la cara *trans*. Como se observa en la figura R27, en ausencia del centrosoma, el AG es capaz de mantener su polaridad intrínseca *cis*-medial-*trans* necesaria para la correcta actividad de la ruta secretora.

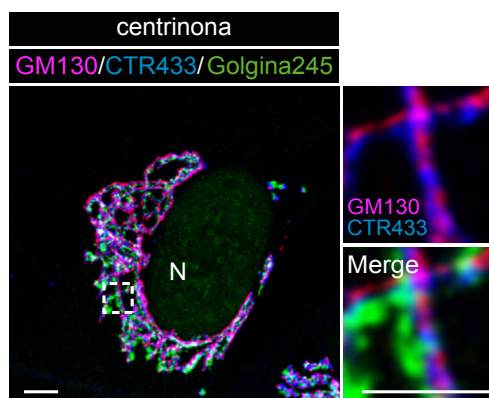


Figura R27. La ausencia de centrosoma no afecta a la polaridad intrínseca del AG. Células RPE1 tratadas con centrinona (125 nM, 5 días) fueron fijadas y marcadas con anti-GM130 (magenta), anti-CTR433 (azul) y anti-Golgina 245 (verde) como marcadores de las caras *cis*, media y *trans* del AG. El recuadro se muestra amplificado en la parte derecha de la imagen resaltando en el panel superior el doble marcaje GM130/CTR433 y en el panel inferior la imagen superpuesta de los tres marcajes (MERGE). La N indica la posición del núcleo. Barras de escala, 5 μ m.

Aunque la polaridad del AG no estaba afectada, nos propusimos confirmar la integridad del “Golgi ribbon”, o lo que es lo mismo, la integridad de la conexión entre los diferentes dictiosomas que componen el AG, para lo que llevamos a cabo experimentos de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*).

Para ello, usamos una línea celular que ha sido generada previamente en el laboratorio (Hurtado et al. 2011) y que tiene el Golgi de color verde gracias a que expresa de forma constitutiva los primeros 81 aa (región transmembrana) de la proteína humana β 1,4- galactosiltransferasa (GT) fusionada a la proteína fluorescente GFP (GT-GFP). Realizamos los experimentos en células controles y células tratadas con centrinona (5 días). Para identificar las células carentes de centrosoma, se transfectó la proteína de fusión Tomato-centrina2, que se localiza en los centriolos. Se seleccionaron células con unos niveles de expresión parecidos y se cuantificó la recuperación de la fluorescencia durante los 150 segundos posteriores al *photobleaching* de un área determinada dentro del AG. Como puede observarse en las imágenes de recuperación de la fluorescencia de la GT-GFP y en la gráfica, la velocidad de la recuperación, así como los valores absolutos a los que se llegó después de los 150 segundos fueron prácticamente idénticos en células controles y células tratadas con centrinona, indicando que

la integridad de la red de cisternas que compone el AG permanece intacta en ausencia de centrosoma.

A

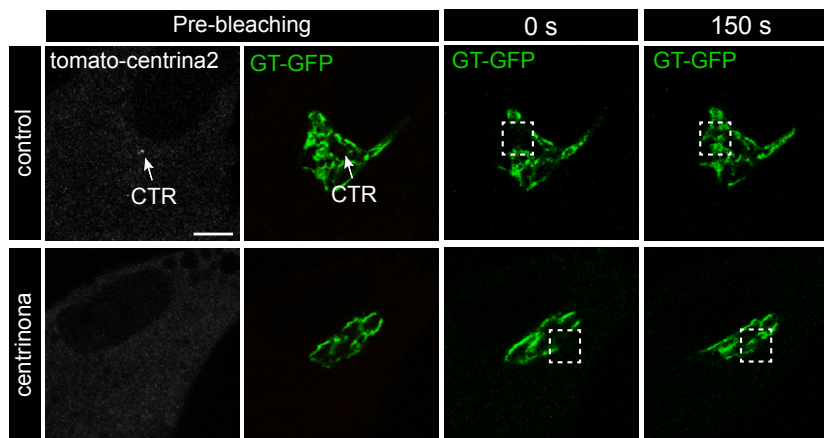
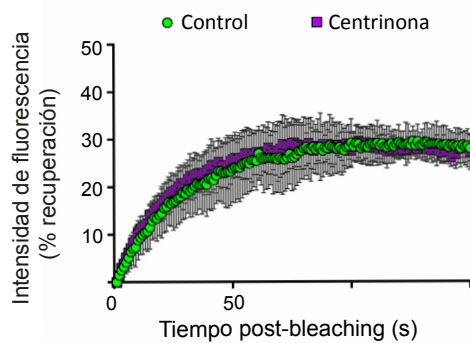


Figura R28. La ausencia del centrosoma no afecta a la integridad de la red de cisternas del AG. (A) Células RPE1 GT-GFP controles (paneles superiores) y tratadas con centrinona (125 nM, 5 días; paneles inferiores) fueron transfectadas con el vector que codifica la proteína de fusión Tomato-centrina2 (para detectar el centrosoma). Se seleccionaron células que expresaban cantidades similares de GT-GFP. Se quemó la señal de GT-GFP

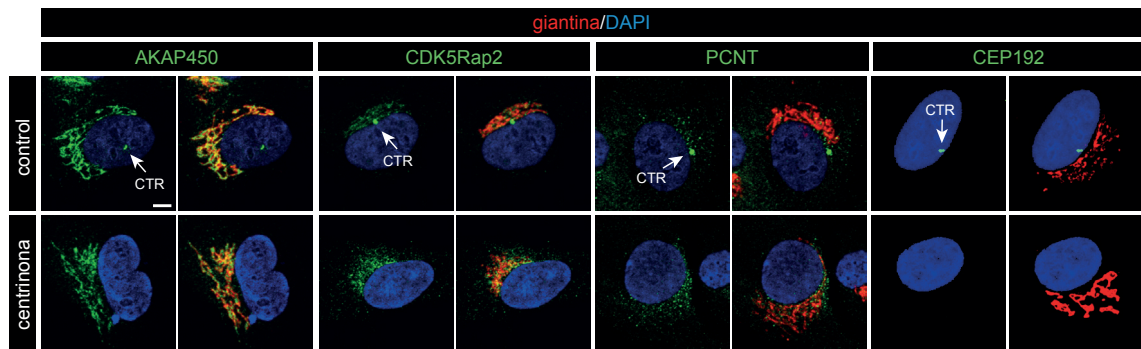
B



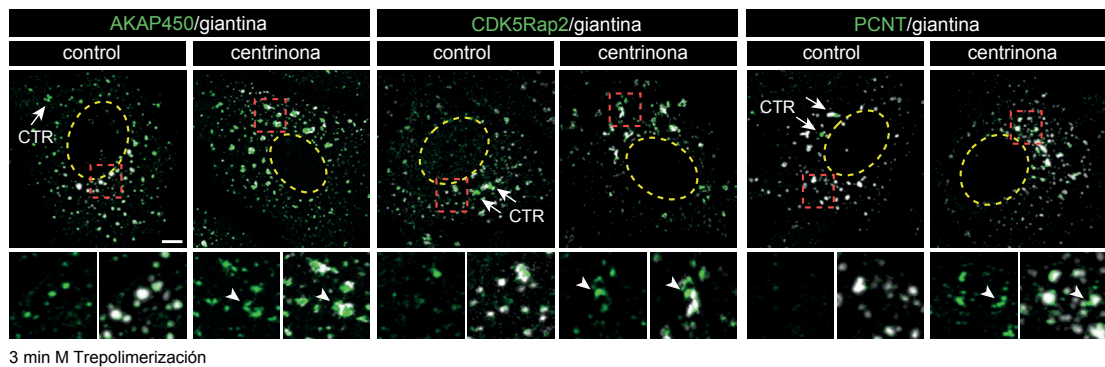
con el láser verde (488-nm) y se monitorizó la recuperación de la señal en ese canal. (Izquierda) Imágenes de las células seleccionadas en antes del *bleaching*. (Se muestran los canales por separado (Tomato-centrina2, blanco; GT-GFP, verde)). (Derecha) Imágenes de las mismas células 0 y 150s post-bleaching respectivamente. Los recuadros indican las regiones en las que se realizó el *photobleaching*. Las flechas marcan el centrosoma (CTR). **(B)** Gráfica que muestra la recuperación de fluorescencia de la proteína GT-GFP asociada al AG en células WT controles (verde) o en células WT tratadas con centrinona (morado), con el 0% correspondiendo a los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos inmediatamente después del bleaching (t₀). Las barras muestran las medias y las desviaciones estándar. La cuantificación se hizo a partir de tres experimentos independientes. (n=5 para cada caso). Barra de escala, 5 μ m.

Una vez comprobado que la integridad como la polaridad intrínseca del AG permanecía inalterada en ausencia del centrosoma, procedimos a analizar la distribución de las proteínas de interés mediante ensayos de IF. Así, observamos que, de acuerdo con lo que ya se había descrito previamente, en ausencia de centrosoma, el AG tiene una localización y morfología normales y que el marcaje de AKAP450 y CDK5Rap2 en este orgánulo es comparable al de las células controles (Wong et al. 2015). Destacando simplemente un ligero aumento en la intensidad de la señal en ensayos de IF. Sin embargo, en el caso de la PCNT, observamos una relocalización clara del marcaje, pasando de estar concentrado en el PCM en células controles a estar formando agregados que se acumulan en torno a las membranas del AG en células tratadas con centrinona (ver Figura R29). Este incremento significativo en la asociación de PCNT con las membranas del AG, no se debe a una redistribución general del conjunto del PCM del centrosoma al AG (ya que no se produjo en el caso de otras proteínas del PCM como CEP192), sino que es un efecto específico que afecta a este subgrupo concreto de proteínas (AKAP450, CDK5Rap2, PCNT) (ver Figura R29).

A

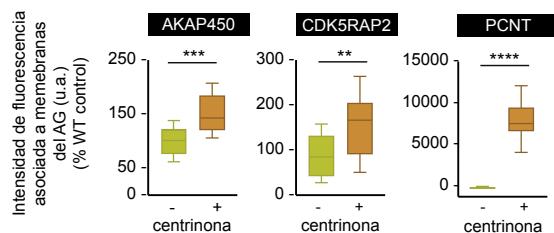


B

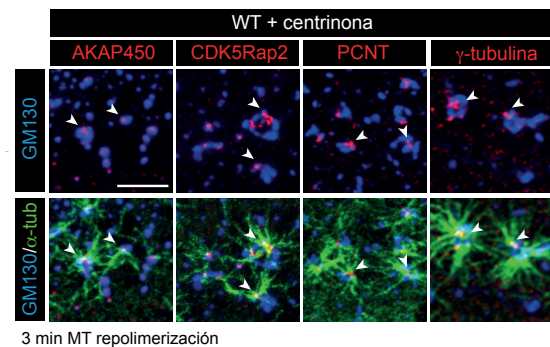


3 min M Trepolimerización

C



D



3 min MT repolimerización

Figura R29. Redistribución de elementos reclutadores de γ TuRC al AG en ausencia de centrosomas. (A) Células RPE1 WT controles (panel superior) y tratadas con centrinona (125 nM, 5días; panel inferior) fueron fijadas y marcadas con anti-AKAP450, anti-CDK5Rap2, anti-PCNT o anti-CEP192 según se indica (en verde); anti-giantina (rojo) como marcador del AG y DAPI (azul). Los paneles de la izquierda muestran el doble marcaje (verde/DAPI) para cada caso; mientras que los paneles de la derecha exhiben los tres marcajes superpuestos. Las flechas apuntan hacia los centrosomas (CTR). (B) Células RPE1 WT controles (panel izquierdo) y tratadas con centrinona (125 nM, 5días; panel derecho) fueron incubadas durante 3 horas en NZ (10 μ M) y posteriormente reincubadas a 37°C durante 3 minutos. Después de la fijación, las células fueron doblemente marcadas con anti-AKAP450, anti-CDK5Rap2 o anti-PCNT según se indica en cada caso (verde) y anti-giantina (blanco) como marcador del AG. Los recuadros se muestran ampliados en la parte inferior de cada imagen mostrando en cada panel de la izquierda el marcaje simple en verde (AKAP450, CDK5Rap2 o PCNT) y en cada panel de la derecha el doble marcaje con giantina. La línea amarilla discontinua representa el contorno del núcleo. Las puntas de flecha apuntan a la acumulación de las respectivas proteínas en la superficie de las membranas del AG. (C) Cuantificación de la asociación entre las diferentes proteínas indicadas y los elementos del AG en células RPE1 controles y tratadas con centrinona. (Ver Materiales y Métodos para más detalles). Los extremos superior e inferior de las cajas corresponde con los percentiles 75 y 25 respectivamente y los 'bigotes' representan los percentiles 90 y 10. La mediana aparece indicada por una línea sólida dentro de cada caja. Se delimitaron elementos individuales del AG en al menos 14 células (más de 500 elementos por experimento), y se determinó la intensidad de fluorescencia

del marcaje de cada proteína asociado a esos elementos del AG. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT y proceden de 2 experimentos independientes. **(D)** Células RPE1 WT tratadas con centrinona (125 nM, 5 días) siguiendo el mismo procedimiento que en (B). Después de la fijación, las células se marcaron con anti-AKAP450, anti-CDK5Rap2, anti-PCNT o anti- γ -tubulina según se indica en cada caso (rojo); anti- α -tubulina (verde) y anti-GM130 (azul) como marcador del AG. Los paneles superiores muestran ampliificaciones con el doble marcaje anti-GM130 y la proteína de interés (rojo) permitiendo observar la colocalización con los elementos del AG. Los paneles inferiores muestran el triple marcaje exhibiendo la nucleación de MTs desde la superficie del AG. Las puntas de flecha indican la localización de las proteínas del PCM sobre la superficie del AG desde donde actúan como sitios de nucleación de MTs. Barras de escala, 5 μ m.

Un análisis mucho más profundo de esta redistribución mediante la cuantificación del marcaje después de un tratamiento con NZ (a fin de fragmentar el AG), reveló que los niveles de AKAP450 y CDK5Rap2 asociados al AG aumentaron en torno a 1,5 veces respecto a los valores observados en las células control (151 y 154 % respectivamente). En el caso de PCNT, la asociación a las cisternas del Golgi en estas condiciones fue mucho más espectacular, observándose un incremento de más del 8000 %. Además, estos agregados de PCNT, colocalizaban de manera específica con los sitios concretos de nucleación de MTs asociados al AG (Ver Figura R29). Estos resultados sugieren por tanto que, en ausencia del centrosoma, estas proteínas son capaces de formar grandes complejos proteicos similares a los presentes en el PCM, pero sobre la superficie del AG, lo que se traduciría finalmente en un incremento en la actividad nucleadora del mismo.

Ante estos datos, nos preguntamos cómo la PCNT, que en condiciones normales no se localiza sobre las membranas del AG en la mayoría de tipos celulares, sí se asocia con las cisternas del AG en células sin centrosoma. Para profundizar en esta cuestión, decidimos analizar la localización en el AG de todas estas proteínas en las líneas mutantes *pcnt* KO, *akap450* KO y *cdk5rap2* KO tras un tratamiento con centrinona. Hay que tener en cuenta que, tras un tratamiento con centrinona de 7 días, en los cultivos celulares de líneas mutantes para PCNT y CDK5Rap2 sólo se identifica un porcentaje muy reducido de células sin centrosoma. Este hecho podría explicarse por el papel esencial que desempeñan estas proteínas en mitosis. Es por ello que, para esos dos casos concretos, el número de células que pudieron ser analizadas es inferior al de las demás condiciones.

Los resultados observados indican que la ausencia de PCNT (células *pcnt* KO) no parece alterar la asociación de CDK5Rap2 ni AKAP450 con el AG en células sin centrosoma (ver Figura 30A). Resultado idéntico al obtenido en las células *cdk5rap2* KO, donde el marcaje de AKAP450 y PCNT tampoco se ve afectado en dichas condiciones (Figura 30A). Sin embargo, en el caso de la ausencia de AKAP450, tanto la PCNT como CDK5Rap2 aparecen disociadas de las membranas del AG (Figura R30A). Este dato ya se observaba para el caso de CDK5Rap2 en las células mutantes de AKAP450 en condiciones normales (Figuras R10C y R20A), pero no se había observado para el caso de la PCNT ya que ésta no presenta un marcaje claro de asociación con las cisternas del Golgi cuando el centrosoma está presente. Así, estos resultados sugieren que, en células que carecen de centrosoma, los complejos basados en PCNT que ya describimos anteriormente (ver Figura R21) se redistribuyen desde el PCM al AG mediante un mecanismo dependiente de AKAP450. ¿Pero son realmente funcionales estos complejos? ¿Son los responsables del incremento de la capacidad nucleadora de MTs del AG en ausencia del centrosoma?

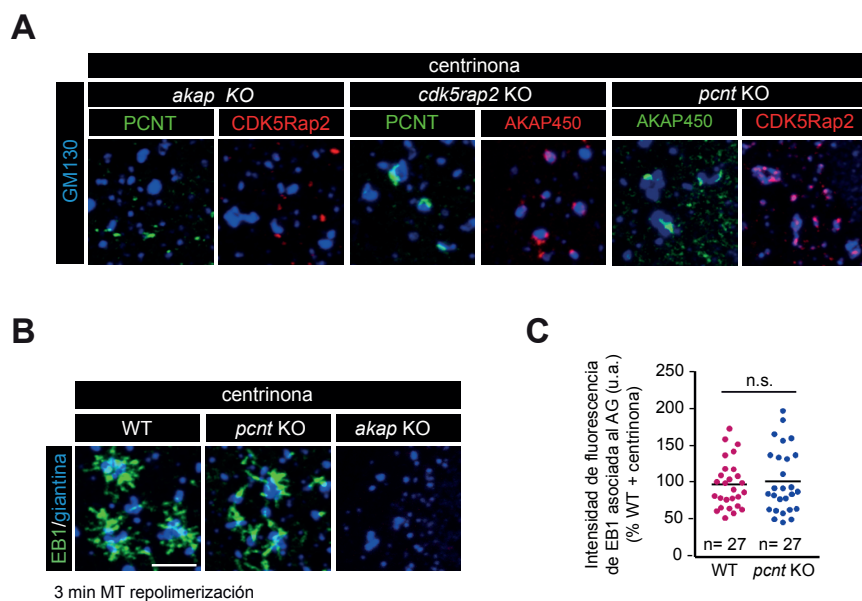


Figura R30. Impacto de la ausencia de centrosomas en la distribución de elementos reclutadores de γ TuRC en el AG y su efecto en la actividad de nucleación de MTs. (A) Células RPE1 *akap450* KO (*akap* KO), *cdk5rap2* KO (*c5rap2* KO) y *pcnt* KO tratadas con centrinona (125 nM) durante 5 días, fueron incubadas durante 3 horas con NZ (10 μ M) para inducir la fragmentación del AG y posteriormente reincubadas a 37°C con medio fresco durante 3 minutos. Después de la fijación, las células fueron marcadas con anti-

cuerpos anti-PCNT, anti-CDK5Rap2 o anti-AKAP450 según se indica y anti-GM130 (azul) como marcador del AG. Los recuadros muestran ampliificaciones de los elementos del AG para detectar la presencia o ausencia de colocación. (B) Células RE1 WT, *akap450* KO y *pcnt* KO tratadas con el mismo procedimiento que en (A) pero marcadas con anti-EB1 (verde) y anti-giantina (azul) como marcador del AG. Los recuadros muestran ampliificaciones de los elementos del AG para detectar la presencia o ausencia de nucleación. (C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de EB1 que colocaliza con el marcaje del AG de tres experimentos independientes como los mostrados en (B) para células RPE1 WT y *pcnt* KO. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student. n.s. = no significativo. Barras de escala, 5 μ m.

Para responder a estas cuestiones procedimos a cuantificar el número de MTs que estaban siendo nucleados desde el AG en ensayos de repolimerización en células controles tratadas con centrinona y en células mutantes para PCNT que también carecían de centrosoma. Los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias significativas entre unas y otras (ver Figura R30B y R30C), indicando que estos complejos basados en PCNT apenas contribuyen al potenciamiento de la actividad nucleadora de MTs desde el AG que se aprecia en las células sin centrosoma. Por ello, podemos concluir que este incremento de la nucleación de MTs asociada al AG en células tratadas con centrinona se debe exclusivamente a un incremento en la distribución de complejos de AKAP450 al mismo, ya que la ausencia de esta proteína da lugar a una inhibición completa de la misma; incluso en células que carecen de centrosoma (Figura R30B y R30C).

3.3. Formación de MTs en ausencia de nucleación asociada al AG y al centrosoma.

Todos los resultados obtenidos hasta ahora, analizados de forma global, apuntaban hacia la existencia de una jerarquía entre los dos principales MTOCs presentes en las células de mamífero en interfase, siendo el centrosoma el regulador principal. Sin embargo, llegados a este punto, quisimos ir un paso más allá y nos preguntamos cuál sería el impacto de inhibir simultáneamente la nucleación de MTs desde estos dos MTOCs en la organización del citoesqueleto celular.

Para responder a esta cuestión, combinamos las dos principales herramientas con las que contábamos para regular la nucleación de MTs desde los dos principales MTOCs: centrinona (que provoca la desaparición del centrosoma y por tanto la nucleación de MTs que de él depende) y la línea celular *akap450* KO (donde la nucleación desde el AG se encontraba inhibida). Lo que observamos fue totalmente inesperado. Bajo estas condiciones, las células aún eran capaces de formar una densa red de MTs con una apariencia relativamente normal (Figura R31). Ante esta observación, quisimos determinar si esta red de MTs se generaba simplemente por una polimerización espontánea y al azar de MTs en el citoplasma celular o si por el contrario, dicha red era consecuencia de un proceso de nucleación desde nuevos MTOCs hasta entonces no identificados.

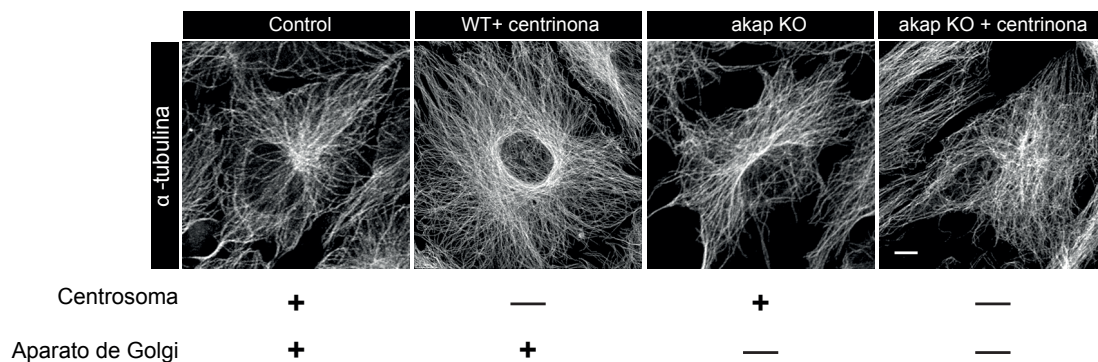


Figura R31. Las células RPE1 son capaces de organizar una red de microtúbulos compleja y funcional cuando los dos principales MTOCs se encuentran inactivos. Células RPE1 WT y *akap450* KO (*akap* KO) en condiciones controles y tras tratamiento con centrinona (125 nM) durante 5 días fueron fijadas y marcadas con anticuerpo anti- α -tubulina (blanco). En la parte inferior de cada imagen, aparece indicado el MTOC activo en esas condiciones. (+) = activo; (-) = inactivo. Barra de escala, 10 μ m.

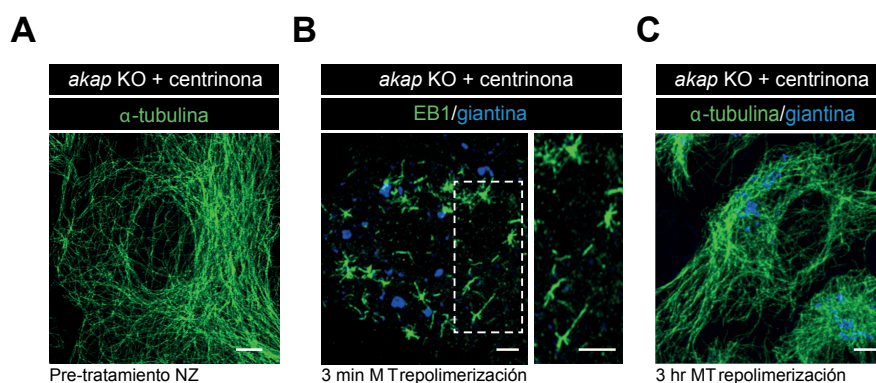


Figura R32. Nucleación citoplásmica desde MTOCs alternativos en ausencia de nucleación de MTs asociada al centrosoma y al AG. (A) Células RPE1 *akap450* KO (*akap* KO) tratadas con centrinona (125 nM) durante 5 días fijadas y marcadas con anti-

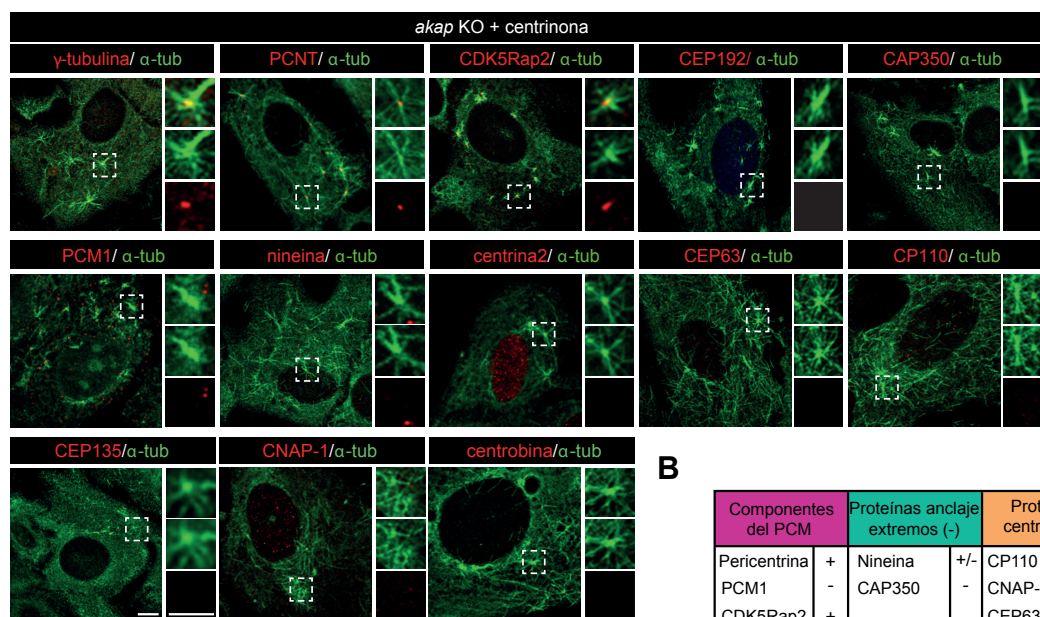
cuerpo anti- α -tubulina (verde). (B-C) Células como en (A) fueron incubadas durante 3 horas en NZ (10 μ M) y posteriormente reincubadas en medio fresco a 37°C durante (B) 3 minutos o (C) 3 horas. Después de la fijación, las células se marcaron con anticuerpos anti-EB1 (B) o anti- α -tubulina (C) y anti-giantina como marcador de AG. El recuadro en (B) aparece amplificado a la derecha mostrando la nucleación de MTs a modo de áster desde localizaciones que no corresponden al AG. Barras de escala, 5 μ m.

Al analizar en profundidad la nucleación de MTs en ensayos de repolimerización a tiempos cortos en estas condiciones, observamos que estos MTs no aparecían de manera aleatoria y aislada, sino que surgían en forma de ásteres distribuidos por todo el citoplasma; siendo nucleados desde estructuras que en ningún caso colocalizaban con las membranas del AG (Figura R32). A tiempos más largos, estas estructuras eran finalmente capaces de generar una densa red de MTs aunque eso sí, de apariencia bastante desordenada (Figura R32). Es decir, habíamos identificado nuevos MTOCs alternativos al AG y el centrosoma a los que denominamos MTOCs citoplasmáticos (cMTOCs).

3.3.1. Caracterización de los MTOCs citoplasmáticos.

A fin de caracterizar en detalle estas nuevas estructuras responsables de la nucleación de MTs; realizamos, bajo estas mismas condiciones, ensayos de IF con un panel de anticuerpos frente a proteínas del PCM, proteínas de unión a extremos (-) de los MTs y proteínas asociadas al centriolo (Figura R33). En estos experimentos observamos que estas estructuras contenían PCNT, CDK5Rap2 y γ -tubulina, pero carecían de otras proteínas del PCM como CEP192 y en la mayoría de los casos PCM1. De igual modo, ninguna de las principales proteínas centriolares testadas, esto es, CEP63, Centrina2, CP110, CEP135, CNAP-1 o Centrobina, colocalizaban con estas estructuras con capacidad de nucleación (Figura R33).

A



3 min MT repolimerización

B

Componentes del PCM		Proteínas anclaje extremos (-)		Proteínas centriolares	
Pericentrina	+	Nineina	+/-	CP110	-
PCM1	-	CAP350	-	CNAP-1	-
CDK5Rap2	+			CEP63	-
γ -tubulina	+			CEP135	-
CEP192	-			Centrina 2	-
				Centrobina	-

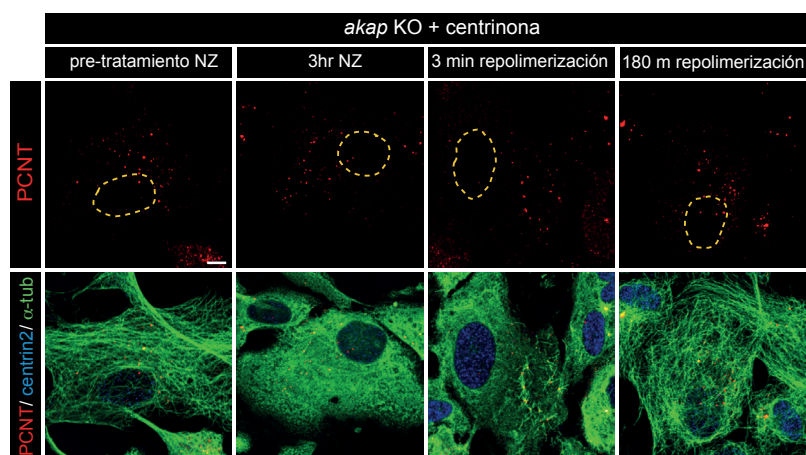
Figura R33. Caracterización de los MTOCs citoplasmáticos. (A) Células RPE1 *akap450* KO (*akap* KO) tratadas con centrinona (125 nM) durante 5 días fueron incubadas con NZ (10 μ M) durante 3 horas y posteriormente reincubadas en medio fresco a 37°C durante 3 minutos. Después de la fijación, las células fueron marcadas con anticuerpos anti- α -tubulina (verde) y el anticuerpo indicado en cada caso (rojo). Los recuadros se muestran ampliados en la parte derecha de cada imagen resaltando en los dos paneles inferiores los marcajes simples para α -tubulina (verde) y la proteína correspondiente (rojo) y en el panel superior la imagen superpuesta de ambos. **(B)** Tabla resumen indicando la presencia (+) o ausencia (-) de las proteínas analizadas en los MTOCs citoplasmáticos. Barra de escala, 5 μ m.

En el caso de proteínas de unión a MTs, la localización fue más variable; encontrándose CAP350 ausente en todos los casos, mientras que nineina lo hacía de forma dependiente del tamaño de las estructuras, siendo sólo visible en aquellas de mayor dimensión. Así, estas estructuras citoplásmicas no parecen ser simples redistribuciones y relocalizaciones de proteínas del centrosoma dada la ausencia del mismo, sino que más bien tendrían una composición similar a los complejos centrosómicos basados en PCNT presentes en las células controles y que bajo estas condiciones presentan capacidad plena para nuclear y anclar MTs.

Posteriormente, analizamos la dinámica de estas estructuras despolimerizando completamente el citoesqueleto de MTs con un tratamiento con NZ y realizando ensayos de IF a diferentes tiempos después del lavado de la droga. Observamos que no existían diferencias significativas ni en el número ni en el tamaño de éstas durante el proceso de polimerización de MTs. Así, estos agregados citoplasmáticos existen tanto en condiciones de ausencia completa de MTs como en presencia de una red completamente desarrollada (Figura R34); indicando que representan complejos estables para la nucleación de MTs y que por tanto pueden ser considerados como verdaderos MTOCs citoplásmicos alternativos (cMTOCs) que no habían sido descritos con anterioridad.

Figura R34. La estabilidad de los cMTOCs es independiente de la presencia de MTs.

Células RPE1 *akap450* KO (*akap* KO) tratadas con centrinona (125 nM) durante 5 días fueron incubadas con NZ (10 μ M) durante 3 horas y posteriormente reincubadas en medio fresco a 37°C. A los tiempos indicados, las células fueron fijadas y marcadas con anticuerpos anti- α -tubulina (verde), anti-PCNT (rojo) y anti-centrina2 (azul) como marcador centriolar. En el panel superior aparecen imágenes del marcaje simple de PCNT y en el inferior se muestran imágenes de los tres marcajes superpuestos. La línea amarilla discontinua marca el contorno del núcleo. (m = min). Barra de escala, 5 μ m.



Para identificar qué factores y elementos son esenciales para la formación de estos MTOCs alternativos, y dado que eran estructuras capaces de nuclear MTs y que contenían tanto PCNT como CDK5Rap2, procedimos a realizar experimentos de siRNA de estas dos proteínas en células mutantes de AKAP450 carentes de centrosoma.

De nuevo, la degradación de CDK5Rap2 no tuvo efecto alguno (como ya ocurrió en las células *cdk5rap2* KO), no impidiéndose la formación de estos MTOCs alternativos ni modificándose la capacidad de nucleación de MTs de los mismos (Figura R30A). Por el contrario, en ausencia de PCNT, no se detectaron ni los MTOCs alternativos ni ningún tipo de elemento a modo de ásteres de MTs en el citoplasma, al menos en ensayos cortos de repolimerización tras el lavado de NZ (Figura R35A).

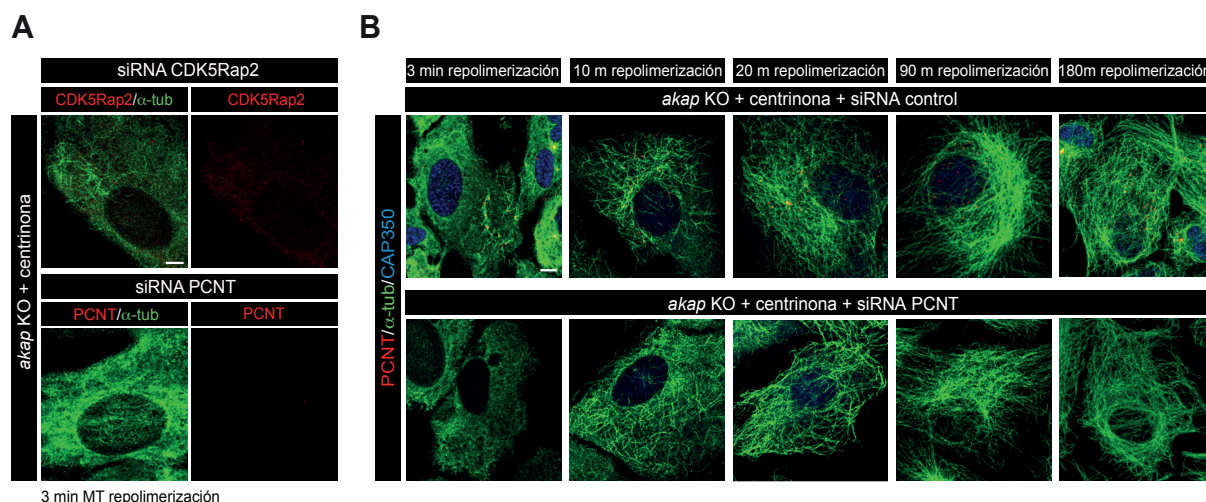


Figura R35. Pericentrina resulta esencial para la estabilidad y función de los cMTOCs. (A) Células RPE1 *akap450* KO (*akap* KO) tratadas con centriona (125 nM) durante 5 días y transfectadas con siRNA frente a CDK5Rap2 o siRNA frente a PCNT durante 72 horas. A continuación, se sometieron a un ensayo de repolymerización, se fijaron a los tiempos indicados y se marcaron con anticuerpos anti- α -tubulina (verde) y anti-CDK5Rap2 o PCNT (rojo). A la derecha se muestra el marcaje simple de la proteína cuya expresión se inhibió en cada caso. **(B)** Igual que en (A) pero mostrando las imágenes superpuestas del triple marcaje anti- α -tubulina (verde), anti-PCNT (rojo) y anti-CAP350 (azul) como marcador centrosómico. (m = min). Barras de escala, 5 μ m.

Estos resultados nos permiten concluir que la ausencia, tanto del centrosoma como de la actividad de nucleación de MTs asociada al AG, no impide la formación de un citoesqueleto de MTs. Bajo estas condiciones, éste se origina a partir de unas estructuras citoplásmicas, formadas por PCNT y CDK5Rap2, que denominamos MTOCs citoplásmicos y cuya existencia es completamente dependiente de la presencia de PCNT.

Sin embargo, la ausencia de PCNT tampoco bloqueó completamente la nucleación de MTs en las células mutantes de AKAP450 tratadas con centriona a pesar de tener un efecto esencial en la formación de estos MTOCs citoplásmicos. Concretamente, experimentos de repolymerización a tiempos más largos mostraron que 10 minutos después de la liberación del NZ, MTs aislados comienzan a ser visibles creciendo de forma dispersa por todo el citoplasma. Este patrón de formación de MTs claramente difiere de aquel observado en células que poseían los denominados cMTOCs, en los que los MTs crecían en forma de ásteres. A pesar de esto, tanto en un caso como en otro, la célula es capaz de generar una red de MTs capaz de rellenar la totalidad del citoplasma celular y, en condiciones en las que no existe ningún MTOC activo en la célula, la formación de dichos MTs sólo se ve retrasada pero no impedida (ver Figura R35B).

Puesto que el proceso de nucleación de MTs desde los principales MTOCs celulares (centrosoma y AG) es dependiente de γ -tubulina, nos preguntamos entonces si la nucleación en ásteres desde los cMTOCs, así como la formación de MTs de forma individual que observábamos en el citoplasma, dependían de esta proteína o si por el contrario se debía a algún mecanismo alternativo. Para dar respuesta a estas preguntas, tratamos las células con gatastatina, un inhibidor de γ -tubulina que es conocido por inhibir parcialmente y retrasar la nucleación de MTs (Chinen et al. 2015) (ver Materiales y Métodos). Así, realizamos ensayos de repolymerización a tiempos cortos en células mutantes de

AKAP450 tratadas con centrinona, en presencia o ausencia de PCNT (uso de siRNA), así como en presencia o no de gatastatina, y analizamos todas estas condiciones mediante ensayos de IF usando como marcador de MTs la proteína de unión a extremos (+) EB1. Como ya habíamos observado anteriormente, no se apreciaron ásteres de MTs ni cMTOCs en células carentes de PCNT, y en su lugar, numerosas “semillas” de MTs aparecieron distribuidos al azar a lo largo de todo el citoplasma (Figura R36). Al emplear la gatastatina, la aparición de MTs se vio notablemente retrasada tanto en presencia de PCNT (condición en la que hay ásteres de MTs saliendo desde los cMTOCs) como en ausencia de la misma (MTs distribuidos al azar en el citoplasma), sugiriendo que la γ -tubulina está implicada en ambos tipos de nucleación citoplásmica de MTs (Figura R36).

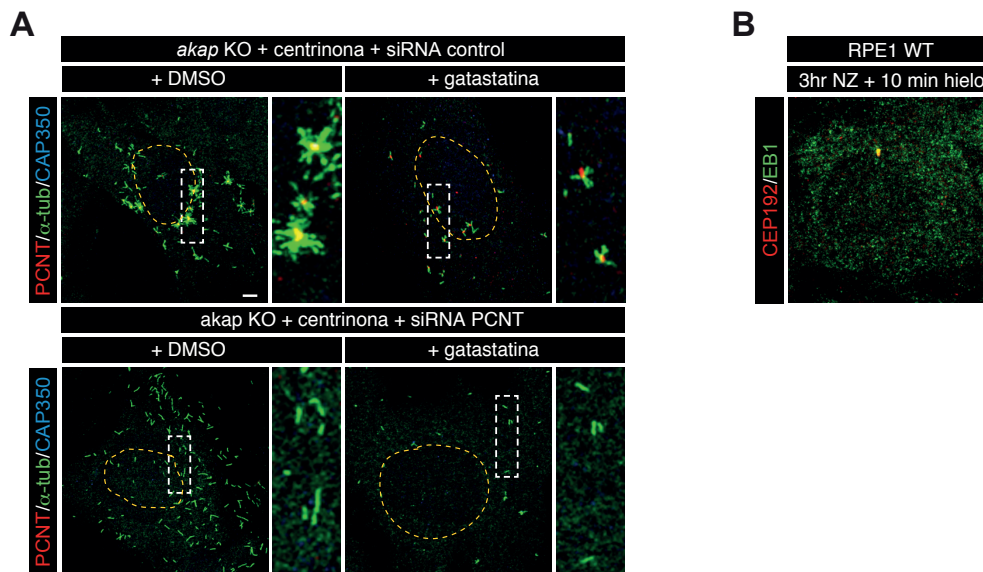


Figura R36. La nucleación de MTs desde los cMTOCs y el citoplasma es dependiente de γ -tubulina. (A) Células RPE1 *akap450* KO (*akap* KO) tratadas con centrinona (125 nM) durante 5 días y transfectadas con siRNA control o siRNA frente a PCNT durante 72 horas fueron sometidas a ensayos de repolimerización. Tras 3 horas de tratamiento con NZ (10 μ M) y el posterior lavado de la droga, las células fueron incubadas con medio con DMSO/gatastatina (30 μ M) en hielo durante 10 minutos y a continuación reincubadas a 37°C en medio completo también en presencia de DMSO/gatastatina según el caso. Finalmente las células fueron fijadas y marcadas con anti- α -tubulina (verde), anti-PCNT (rojo) y anti-CAP350 (azul). Los recuadros aparecen ampliados a la derecha de cada imagen mostrando la nucleación de MTs desde los cMTOCs o el citoplasma. **(B)** Células RPE1 WT tratadas con NZ (10 μ M) e incubadas durante 10 minutos en hielo tras el lavado de la droga. Las células fueron fijadas y teñidas para EB1 (verde) y CEP192 (rojo). No se observa señal alguna de EB1 en el citoplasma, lo que demuestra la completa despolimerización de MTs bajo las condiciones empleadas en (A). Barras de escala, 5 μ m.

De este modo, en la jerarquía que proponíamos anteriormente, debemos incluir estos MTOCs alternativos (cMTOCs), que sólo estarán activos y presentes cuando la nucleación desde el centrosoma y el AG se encuentran simultáneamente inhibidas, y que en nuestra opinión, podrían considerarse elementos esenciales para incrementar la plasticidad del proceso de nucleación y con ello facilitar o permitir la formación de una red completa de MTs en determinadas condiciones. En cualquier caso, parece claro que, independientemente del origen que presenten, todos los procesos de formación de MTs que hemos estudiado hasta el momento son en definitiva dependientes de la presencia de γ -tubulina.

**CAPÍTULO IV. EFECTO DE LOS CAMBIOS EN LA DINÁMICA DE NUCLEACIÓN
DESDE LOS DIFERENTES MTOCs EN LA ARQUITECTURA GLOBAL DEL
CITOESQUELETO DE MICROTÚBULOS.**

Dada la existencia de esta organización jerárquica entre los diferentes MTOCs de la célula, nos preguntamos cuáles serían las consecuencias de todas estas manipulaciones de las actividades de nucleación de MTs en el establecimiento y la organización general de la red de MTs que conforman el citoesqueleto de la célula. En este capítulo se presentan los experimentos realizados encaminados a determinar el papel de cada uno de los MTOCs celulares, en la organización de la red de MTs en interfase y los mecanismos que lo explican.

4.1. Repercusión de la jerarquía existente en la organización de los diferentes MTOCs sobre la red global del citoesqueleto de microtúbulos.

Para poder analizar cuantitativamente el citoesqueleto de MTs bajo todas estas condiciones, realizamos ensayos de IF en células WT, mutantes simples y mutantes dobles en condiciones de presencia y ausencia de centrosoma. La intensidad de fluorescencia de α -tubulina se usó como medida de la masa total de MTs de la célula. De forma paralela, también se cuantificó el número total de cometas de EB1 en cada célula individualmente, lo que representaba un método alternativo e independiente para la cuantificación del número de MTs, dotando de solidez a los resultados.

Lo primero que nos llamó la atención al observar las células fue que, aquellas que carecían de centrosoma, parecían ser más grandes que las células controles. Este hecho ya había sido puesto de manifiesto en un artículo reciente (Wu et al. 2016), lo que nos llevó a realizar un análisis con más profundidad. En primer lugar, usamos citometría de flujo para estimar el volumen de las células gracias a los valores obtenidos por el detector de dispersión frontal (FASC en inglés) y observamos un incremento significativo de aproximadamente un 30% en células WT tratadas con centrinona, en comparación con las células controles. Este dato se complementaba con la preferencia de las células tratadas con centrinona a adherirse a *micropatterns* de mayor superficie que los de las células controles (ver Materiales y Métodos; Figura R37), indicando inequívocamente que poseen mayor tamaño que en las condiciones control.

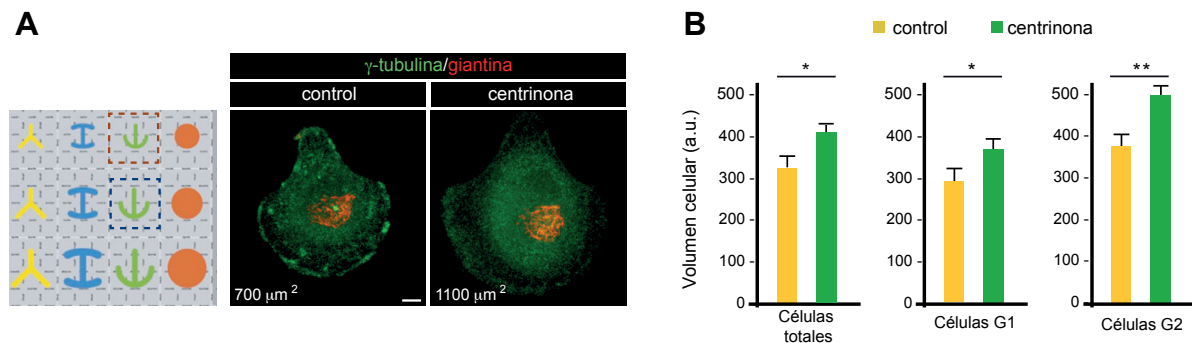


Figura R37. La ausencia de centrosoma afecta al volumen celular. (A) (Izquierda) Representación gráfica de las diferentes geometrías y tamaños presentes en los chips empleados. Los recuadros indican las superficies en las que se depositaron las células controles (naranja) y las células tratadas con centrinona (azul). (Derecha) Imágenes de microscopía confocal de células RPE1 WT controles y tratadas con centrinona (125 nM durante 5 días) sembradas sobre cubreobjetos con forma de ballesta (*crossbow-shaped micropattern*) de la empresa CYTOO SA, que obligan a la célula a establecer una conformación específica. Se muestra un marcaje para γ -tubulina (verde) y giantina (rojo). Los valores en μm^2 el área aproximada de la célula en función del cubreobjeto sobre

el que se deposita. **(B)** Análisis cuantitativo del volumen celular mediante FACS en células RPE1 WT controles y tratadas con centrinona (125 nM durante 5 días). Se muestran valores para células en G1, G2 y el conjunto de éstas. Las barras representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Barras de escala, 5 μ m.

De este modo, y dado que este aumento del área celular podría afectar a la interpretación de los resultados, decidimos obtener para cada célula individual tres parámetros: la intensidad de fluorescencia de α -tubulina (como medida de la masa total de MTs de la célula), el área de la célula y la densidad de MTs (intensidad de fluorescencia de α -tubulina / área de la célula).

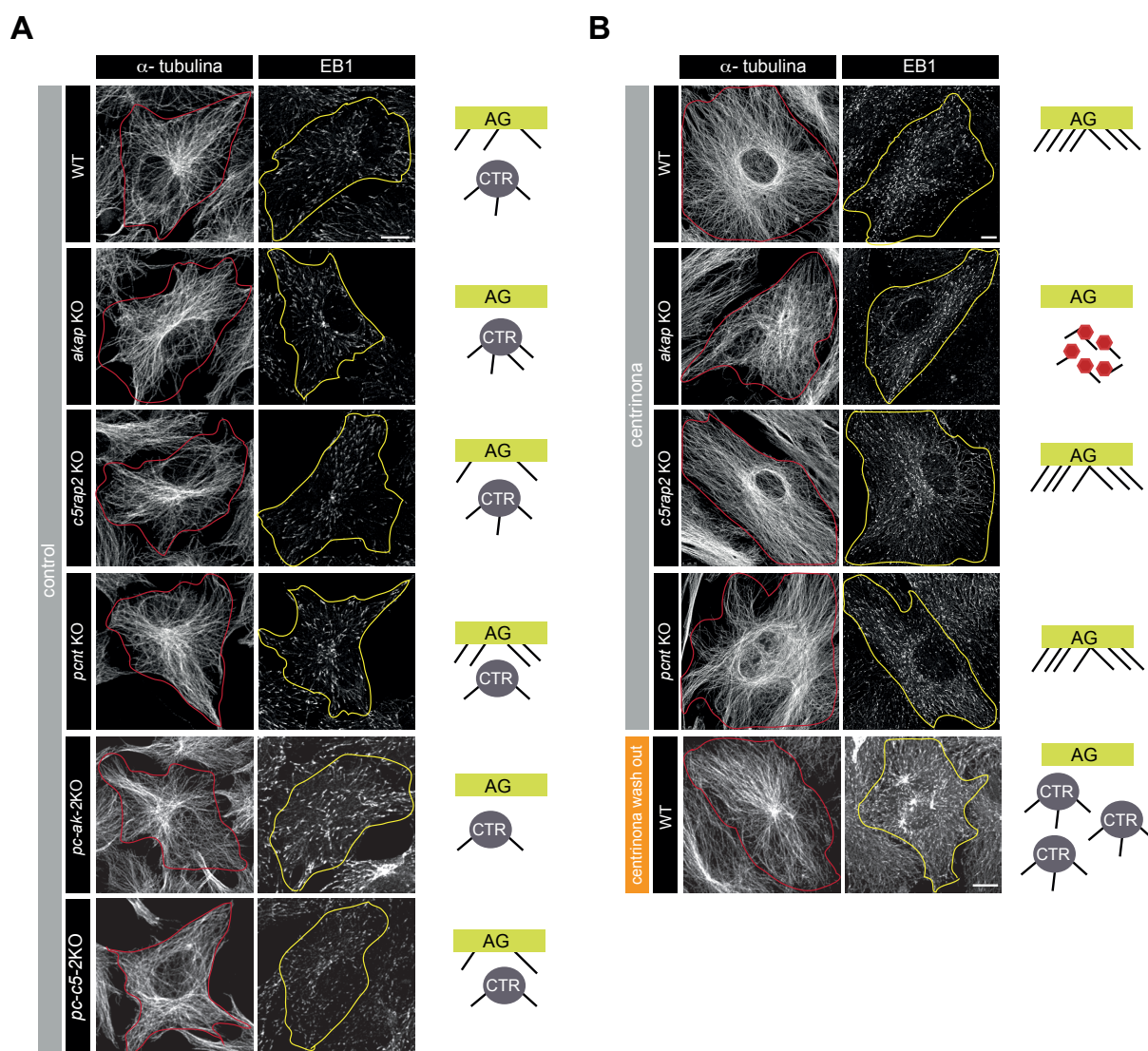


Figura R38. El centrosoma limita la densidad de MTs del citoesqueleto celular.

(A) Imágenes de microscopía confocal mostrando la red de MTs en células RPE1 WT, *akap450* KO (*akap* KO), *cdk5rap2* KO (*c5rap2* KO), *pcnt* KO, *pcnt/akap450* KO (*pc-ak-2KO*) y *pcnt/cdk5rap2* KO (*pc-c5-2KO*). Las células fueron fijadas y marcadas con anticuerpos anti- α -tubulina (panel izquierdo) o anti-EB1 (panel derecho). Las líneas rojas y amarillas indican el contorno de la célula. Una representación esquemática de los MTOCs activos en cada caso se muestra a la derecha de las imágenes. AG = Aparato de Golgi; CTR = centrosoma; — = MTs. **(B)** Igual que en (A) pero en células RPE1 WT, *akap450* KO, *cdk5rap2* KO y *pcnt* KO tratadas con centrinona. También se incluyen en el panel final imágenes de células con centriolos extra tras el lavado de la centrinona. Barras de escala, 10 μ m.

Los resultados mostraron que la ausencia de AKAP450, CDK5Rap2 o PCNT de forma individual, así como simultánea de PCNT/AKAP450 o PCNT/CDK5Rap2 sólo provocó ligeras variaciones en el área celular (un 15, 10, 12, 5 y 2 % de reducción respectivamente) en comparación a las células controles (Figura R38 y R39). Por el contrario, y en línea con lo que se había observado anteriormente, la pérdida del centrosoma en células WT provocó un incremento de hasta casi 3 veces (275.9%) en el área, respecto a las células no tratadas con centrinona. Este dato es notablemente superior al incremento de volumen observado previamente por FACS en estas condiciones, lo que sugiere que, además del incremento de volumen, la adhesión al sustrato también se altera en las células sin centrosoma. De la misma forma, observamos un incremento muy parecido en la superficie de células mutantes para CDK5Rap2 (248%) y para PCNT (299.8%) en ausencia del centrosoma, apoyando que éste va a desempeñar algún papel esencial en la regulación de la adhesión celular al sustrato. En el caso de las células *akap450* KO que carecían de centrosoma, también se observó un aumento en este parámetro, aunque mucho más moderado (42% más). Como control, usamos células WT tratadas con centrinona después del lavado de la droga (que como se ha mencionado anteriormente contenían un número elevado de centrosomas) y observamos que se minimizaba considerablemente el incremento derivado de la pérdida de centrosomas, pasando de un 275.9% a solo un 63%. En el caso de los dobles KO tratados con centrinona no encontramos ninguna célula sin centrosoma, por lo que no pudimos analizar el efecto de la ausencia del mismo en ninguno de los parámetros analizados (Figura R38 y R39).

Por todo ello y aunque parece clara la necesidad de profundizar en la caracterización de este fenotipo, estos resultados apuntan firmemente a que el centrosoma en sí, su presencia y el número de éstos, es capaz de influir y regular en cierta medida la adhesión celular.

El resto de parámetros analizados, es decir, la masa total de MTs y la densidad de los mismos, también se modificaron a lo largo de las distintas condiciones analizadas. Así, en el caso de células mutantes simples de AKAP450 y PCNT, observamos una reducción de en torno a un 18 y 9% en la masa de MTs con respecto a las células controles. Esta reducción era muy parecida a la observada al cuantificar el área en estas líneas celulares por lo que, en definitiva, tanto los mutantes de AKAP450 como los de PCNT presentaron unos valores de densidad de MTs muy similares a los de las células silvestres (96.6 y 104% respectivamente) (ver Figura R39). Por su parte, la inhibición de la expresión de CDK5Rap2 tuvo un efecto mucho más pronunciado en la densidad de MTs, obteniéndose una disminución significativa de entorno al 20%, que podría explicarse por el papel que parece desempeñar esta proteína en la estabilización de MTs (Fong et al. 2009). Sorprendentemente, los mutantes dobles PCNT/AKAP450 y PCNT/CDK5RAP2 apenas presentaron cambios ni en el área celular ni en la masa de MTs, con lo que los valores de densidad de MTs obtenidos en ambos casos fueron muy similares a los de las células controles (incremento de 17 y 7 % respectivamente).

En cuanto a la cuantificación del número de cometas de EB1, las modificaciones a lo largo de los diferentes grupos analizados con respecto a las células silvestres, fueron congruentes con las observadas para la masa total de MTs (ver Figura R39).

Sin embargo, todas estas diferencias podrían considerarse despreciables a la hora de comparar esos resultados con el efecto que tuvo la pérdida del centrosoma en la red global de MTs. De hecho, la

ausencia del centrosoma en las células WT provocó un incremento significativo de hasta cinco veces (550%) en la masa total de MTs, lo que teniendo en cuenta el incremento en el área, se tradujo en un aumento del doble en la densidad de MTs (199.5% respecto a las células WT).

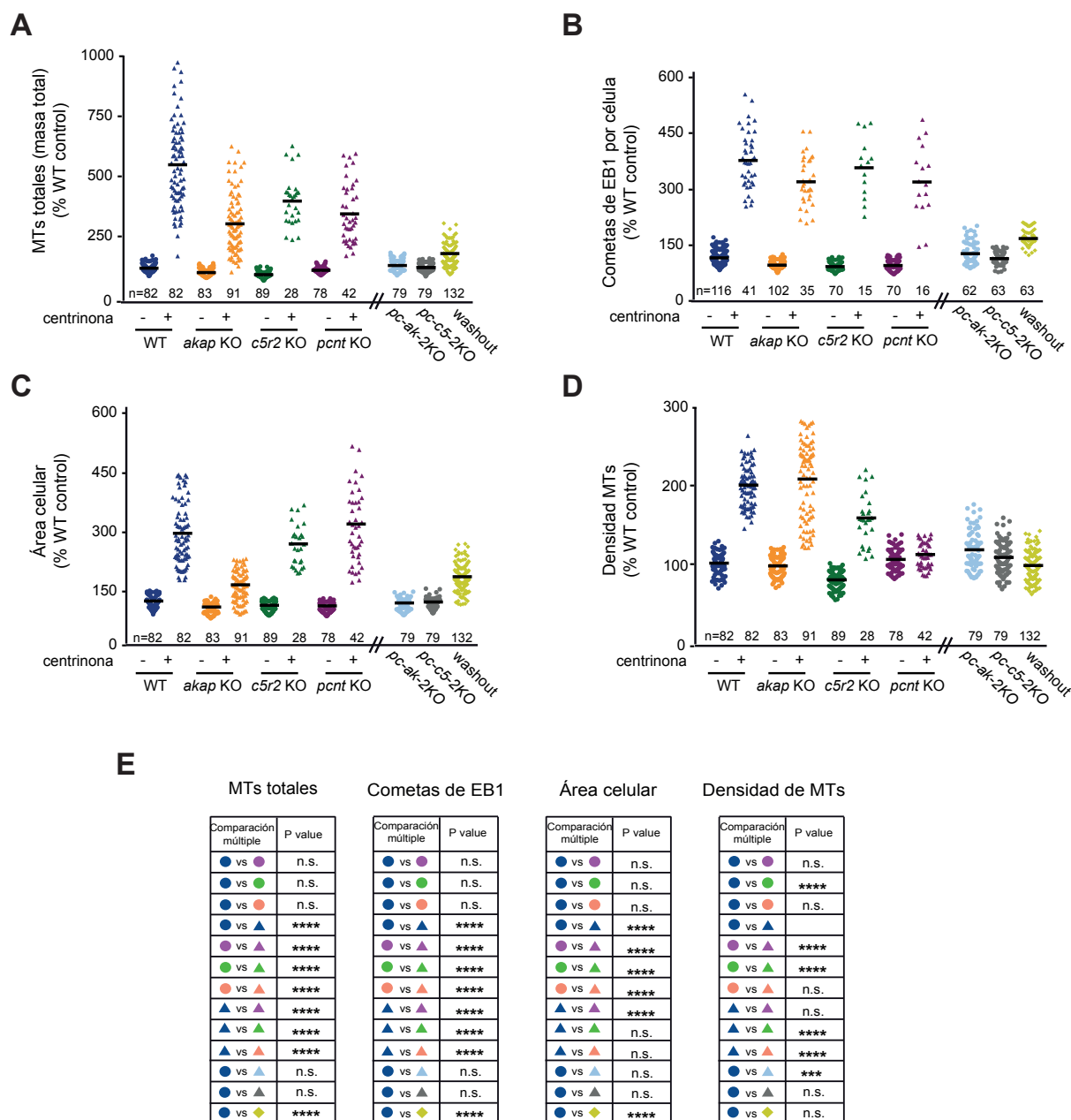


Figura R39. El centrosoma limita la densidad de MTs del citoesqueleto celular.

(A-D) Cuantificación de (A) la intensidad de fluorescencia de α -tubulina (como medida de la masa total de MTs), (B) el número de cometas de EB1 por célula, (C) el área celular y (D) la densidad de MTs (MTs totales/área celular) en las condiciones mostradas en (A) y (B). Cada uno de los puntos del gráfico de dispersión corresponde a un valor individual. Las líneas negras horizontales representan la media de todos los valores. Los valores están normalizados respecto a la media obtenida para las células RPE1 WT controles y proceden de 3 experimentos independientes. (E) Tabla resumen de los datos estadísticos de los resultados mostrados en (A-D).

Para el análisis estadístico se empleó la prueba ANOVA seguida de un test de Tukey's. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; n.s.= no significativo.

Por su parte, las células mutantes de AKAP450 y CDK5Rap2 tratadas con centrinona también incrementaron su masa total de MTs (en un 294.1% y 392.8% respectivamente con respecto a las células controles), dando lugar a un incremento de 2 y 1,67 veces en la densidad de MTs, si tenemos en cuenta los datos del área de las células en esos grupos. Así, en todos estos casos, la pérdida del centrosoma se tradujo en un incremento tanto en la masa total de MTs como en la densidad de los mismos; resultados que fueron refrendados en todos los casos con los valores de la cuantificación del número de cometas de EB1 (ver Figura R39).

La única excepción se dio en las células mutantes de PCNT en las que la desaparición del centrosoma, a pesar de acompañarse de un incremento en la masa total de MTs, solo se tradujo en un ligero incremento de la densidad de la red de MTs, al tener en cuenta los valores tan elevados del área de las células.

Por último, al cuantificar estos mismos parámetros en células que contenían un número elevado de centrosomas (tras el lavado de centrinona), observamos que pese a presentar un aumento de unas 1.5 veces, tanto en la masa de MTs como en el número de cometas de EB1, con respecto a las células controles; el incremento en el área celular fue muy parecido, por lo que la densidad de MTs que mostraron fue prácticamente idéntica a la de las células controles (Figura R39).

Estos resultados por tanto, apuntan claramente a que el centrosoma es capaz de regular la cantidad de MTs presente en la célula, y sugieren a la PCNT como una pieza clave en esta interconexión entre la pérdida de centrosoma y la densidad de MTs.

Una de las posibles hipótesis que podrían explicar el incremento de la densidad de MTs en las células desprovistas de centrosoma sería la de un incremento del contenido global de las α/β tubulinas, y no un aumento específico de la capacidad de nucleación de la célula. Así, para descartar este hecho procedimos a cuantificar la cantidad total de α y β -tubulina mediante ensayos de WB en células controles y células sin centrosoma. Más concretamente, las células fueron tratadas con centrinona o DMSO respectivamente durante 5 días, tras los que se obtuvieron extractos proteicos totales de ambas condiciones. Los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias en ningunas de las isoformas de tubulina entre las dos condiciones al normalizar los valores obtenidos tanto con Hsp70 (empleado como control de carga) como con la cantidad total de proteína (se empleó para ello la cuantificación de un gel tratado con Azul de Commassie) (ver Figura R40). Estos datos apoyarían que la ausencia de centrosoma no afecta a los niveles de expresión de las distintas isoformas de tubulina (α y β), sino que más bien modificaría el equilibrio dímeros solubles/polímeros, de tal forma que la ausencia de centrosoma facilitaría mediante algún mecanismo específico la polimerización de los dímeros de α y β tubulina en forma de MTs, originando un incremento en la masa total de los mismos presentes en la célula.

Vistos de forma global, todos estos resultados sugieren que el centrosoma es capaz de controlar el número de MTs presentes en la célula, independientemente desde donde estén siendo nucleados, ya sea el AG en células tratadas con centrinona o bien los MTOCs citoplásmicos en células mutantes de AKAP450 tratadas con la droga.

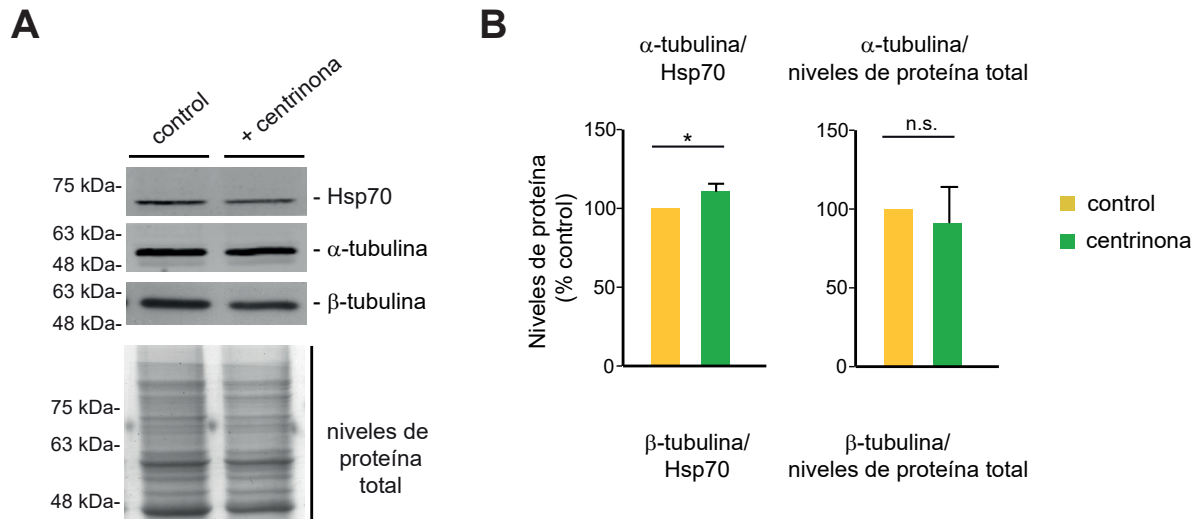
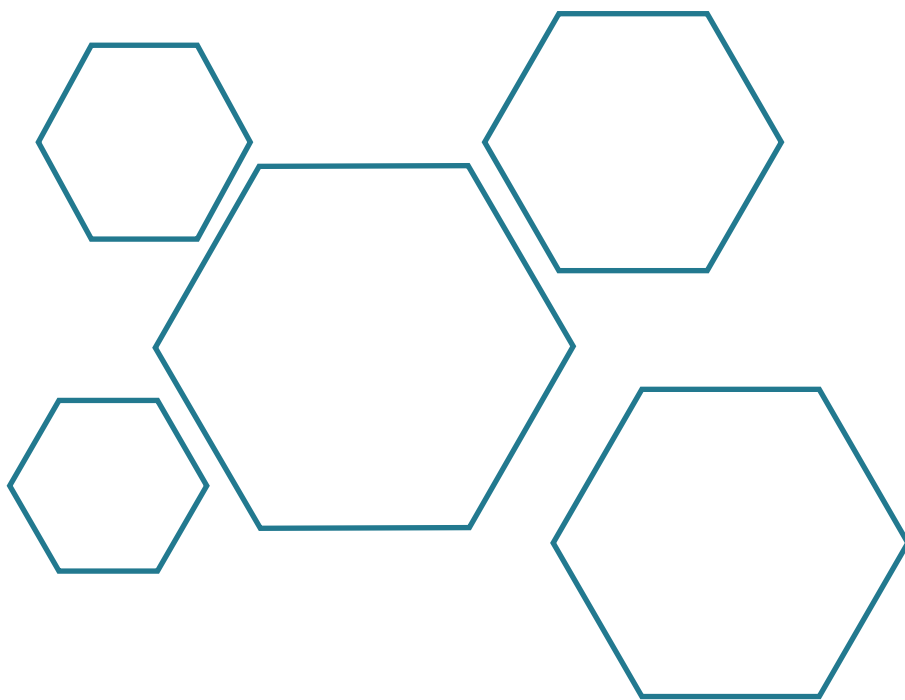


Figura R40. La ausencia de centrosoma no provoca un incremento en la expresión de α -/ β -tubulina. (A) (Parte Superior) Extractos celulares de células RPE1 WT controles y tratadas con centrinona (125 nM durante 5 días) se cargaron en paralelo en dos geles. Un gel se usó para analizar por WB los niveles de expresión de α -tubulina y β -tubulina. Hsp70 se usó como control de carga. (Parte inferior) El segundo gel se tiñó con Azul de Coomassie para normalizar los valores de proteína total. (B) Análisis densitométrico de experimentos como el mostrado en (A). Se muestra la cuantificación de los niveles de α -tubulina (parte superior) y β -tubulina (parte inferior) normalizados con respecto a los niveles de Hsp70 o de proteína total. Los datos se expresan en % respecto al control. Las barras representan la media \pm DE de tres experimentos independientes. Para el análisis estadístico se empleó la prueba t de Student. * $p < 0.05$; n.s.= no significativo.

Además, parecen apoyar la idea de que la actividad del centrosoma no solo controlaría la distribución celular de la actividad nucleadora de MTs, sino también poseería la capacidad de limitar el propio número de MTs presentes en la célula bien regulando la potencialidad de nucleación de MTOCs alternativos así como controlando su propia actividad.

DISCUSIÓN



La organización de la red de MTs es esencial para el control de diferentes procesos celulares tales como la segregación cromosómica, la polaridad o el transporte de orgánulos así como en el establecimiento de la posición o morfogénesis celular. La geometría y el patrón de esta red no se establecen de forma aleatoria, sino que depende fuertemente de la localización y actividad de los sitios subcelulares desde donde los MTs son nucleados. Estos sitios, a menudo, son acumulados en estructuras concretas denominadas centros organizadores de microtúbulos (MTOCs). En células animales que proliferan, el centrosoma actúa como el principal MTOC celular. Sin embargo, el Aparato de Golgi (AG) también presenta capacidad para nuclear MTs en células en interfase, siendo el responsable de aproximadamente el 50% de la nucleación de MTs en estas condiciones (Efimov et al. 2007). En numerosos tipos de células diferenciadas, estas funciones de MTOC aparecen reasignadas a otras localizaciones no centrosómicas a fin de generar una organización de MTs no radial que encaje mejor con el desarrollo de cierto tipo de funciones celulares (transporte intracelular, apoyo mecánico, etc). Así, dada la importancia del control de estos eventos de nucleación en espacio y tiempo, la existencia de esta pluripotencialidad intracelular despertó grandes incógnitas a cerca de la regulación y coordinación entre todos los MTOCs celulares.

De este modo, en este trabajo quisimos analizar en detalle e interpretar la relación funcional presente entre los dos principales MTOCs celulares en interfase: el centrosoma y el AG. Para ello, generamos líneas celulares hTERT-RPE1 simples o dobles mutantes para los factores reclutadores de γ TuRCs presentes en ambos orgánulos (PCNT, AKAP450 y CDK5Rap2) combinado con el empleo de centrinona para generar células sin centrosoma. Así, hemos desvelado que estas tres proteínas desempeñan un papel importante en el control y regulación de la nucleación de MTs mediada por el AG, pero presentan una contribución poco destacada en la nucleación desde el centrosoma, siendo esta última mucho más dependiente de la actividad de la proteína CEP192 y otros mecanismos alternativos. Combinando las dos herramientas citadas (centrinona y líneas mutantes), nuestras observaciones sugieren la existencia de una jerarquía en el proceso de nucleación de MTs en la que el centrosoma es capaz de regular este mecanismo en otras localizaciones subcelulares. Así, la inhibición de la nucleación desde el AG vía eliminación de AKAP450 no altera la actividad nucleadora del centrosoma. Sin embargo, la eliminación de centrosomas (vía centrinona) sí estimula la nucleación desde el AG dependiente de AKAP450, mientras que a su vez, la presencia de centrosomas extra inhibe esta nucleación no centrosómica.

Estos resultados, que demostraban la existencia de una regulación de la actividad entre ambos MTOCs, planteaban la duda de cuál o cuáles eran los efectos de inhibir la nucleación en ambas localizaciones subcelulares. Así, al inhibir la nucleación desde el AG en células sin centrosoma se induce la formación de complejos citoplásmicos que contienen PCNT, CDK5Rap2 y γ -tubulina y que adquieren capacidad de nucleación permitiendo la formación de un citoesqueleto desordenado pero lo suficientemente denso como para cubrir toda la superficie celular. Adicionalmente, la eliminación de PCNT bajo estas condiciones promueve la aparición de MTs individuales a lo largo de todo el citoplasma, y tanto en un caso como en otro, esta nucleación implica la presencia de γ -tubulina. Finalmente hemos observado que, independientemente del origen de nucleación de los MTs (AG o complejos

citoplásmicos), las células acentriolares presentan una red de MTs mucho más densa que la observada en condiciones normales.

De este modo, nuestros resultados apoyan la existencia de un modelo para la organización y control de la red de MTs en interfase en el cual el centrosoma desempeña un papel principal ejerciendo su actividad nucleadora mientras negativamente regula la nucleación desde el AG e inhibe el ensamblaje de MTs desde el citoplasma.

Regulación de la nucleación de MTs en interfase: jerarquía de los diferentes MTOCs

Como hemos observado, los resultados presentados en este trabajo revelan la existencia de notables diferencias en el papel de los considerados como principales reclutadores de γ TuRCs en el centrosoma y en el AG. Estos datos apoyan la existencia de al menos dos tipos de complejos proteicos reclutadores de γ TuRCs: aquellos basados en AKAP450 (contienen AKAP450-CDK5Rap2) y los basados en PCNT (formados por PCNT-CDK5Rap2). La presencia de PCNT, AKAP450 o CDK5Rap2 se ha observado que no es necesaria para la nucleación de MTs desde el centrosoma. De hecho, en las células carentes de las tres proteínas (y probablemente también de miomegalina (Roubin et al. 2013)), los centrosomas eran capaces de nuclear MTs a ratios similares a las condiciones control. Por el contrario, la nucleación de MTs desde el AG sí se vio afectada en todas las condiciones, pasando desde una inhibición completa como consecuencia de la eliminación de AKAP450, hasta un ligero incremento de la actividad en las células carentes de PCNT. Por su parte, la falta de CDK5Rap2 sólo redujo ligeramente la actividad nucleadora del AG, lo que sugiere que CDK5Rap2, al igual que su parólogo miomegalina (Wu et al. 2016), debe estar contribuyendo a otros aspectos implicados en la formación de MTs tales como estabilización o anclaje, pero no en el proceso de nucleación propiamente dicho. De este modo, los factores tradicionales de unión a γ TuRCs son esenciales en la actividad como MTOC del AG, pero no del centrosoma, donde el escenario planteado parece más complejo. En este caso, el reclutamiento centrosómico de PCNT y AKAP450 parece correlacionar inversamente, posiblemente debido a la competencia de estas proteínas por los sitios de unión a *PACT domain* existentes en el PCM. Así, con los datos obtenidos, estimamos que solo en torno a un 40% de la γ -tubulina del centrosoma depende del balance que se establece entre las proteínas PCNT y AKAP450, desempeñando esta última un claro papel inhibitorio en su reclutamiento dado el incremento del marcaje de γ -tubulina observado en los centrosomas de células *akap450* knock-out.

En este aspecto, nuestros datos indican que, al contrario que PCNT, AKAP450 y CDK5Rap2; CEP192 sí desempeña un papel fundamental en la nucleación de MTs desde el centrosoma tanto en presencia como en ausencia de los tres principales factores reclutadores de γ TuRCs, ya que su eliminación afecta significativamente a esta actividad. Sin embargo, para nuestra sorpresa, en las condiciones de eliminación de PCNT, AKAP450, CDK5Rap2 y CEP192, el centrosoma aún presentaba en torno al 50% de su capacidad para nuclear MTs, sugiriendo la existencia de mecanismos y factores adicionales que promueven la nucleación de MTs desde esta localización subcelular. De hecho, este mecanismo podría estar siendo regulado de forma independiente a γ -tubulina por medio de otras proteínas adicionales tales como chTOG o TPX2 (Woodruff et al. 2017).

Nuestros resultados son consistentes con distintos estudios en diferentes organismos en los que la PCNT no parece participar en la nucleación de MTs en interfase (Dammermann and Merdes 2002; Zimmerman et al. 2004) e incluso presentar cierto grado de actividad inhibitoria tanto en el centrosoma (Lerit and Rusan 2013) como en el AG (O'Rourke et al. 2014). Además, en las células carentes de CDK5Rap2, no fuimos capaces de detectar ningún defecto significativo ni en el reclutamiento de γ TuRCs al centrosoma ni en la actividad nucleadora de MTs de éste, resultados que claramente contradicen datos publicados en los que sí se indica el papel esencial tanto de PCNT como de CDK5Rap2 en el centrosoma (Choi et al. 2010; Cota et al. 2017; Muroyama, Seldin, and Lechler 2016). Una posible explicación a tales discrepancias podría atribuirse al hecho de que estas proteínas desempeñen funciones específicas dependiendo del organismo, el tipo celular o la fase del ciclo en el que se encuentren. La mayoría de los trabajos realizados en este sentido se han basado siempre en el análisis de la contribución de estas proteínas en mitosis, por lo que es necesario un estudio mucho más profundo para finalmente dilucidar el verdadero papel de estos tres factores reclutadores de γ TuRCs en la célula en interfase.

Aun así, nuestros datos parecen indicar la existencia de una regulación por parte del centrosoma sobre la actividad nucleadora del AG, ya que modificaciones en la capacidad del centrosoma como MTOC (ya sea en número o función) afectan al AG, pero no al contrario; y estos resultados apuntan a que esta regulación recae en cierta medida en el papel de PCNT. De hecho, la capacidad del AG para nuclear MTs se vio incrementada tanto en la condición de pérdida de centrosoma (tratamiento con centrinona) como en la de eliminación de PCNT. Además, la eliminación de esta proteína reclutadora de γ TuRCs también previene el incremento notable de la densidad de MTs provocado por la pérdida del centrosoma. Todo ello nos lleva a plantearnos cuál es la función de los complejos (PCNT-CDK5Rap2) en el centrosoma y el AG. Aunque se trate sólo de una especulación, parece posible que, además de sus funciones en la organización del PCM, la PCNT sea capaz de algún modo de permitir que el centrosoma sense y controle la nucleación de MTs en otras localizaciones gracias a su capacidad para actuar como plataforma de señalización (Arquint, Gabryjonczyk, and Nigg 2014), estableciendo así una regulación del conjunto del citoesqueleto de MTs.

De este modo, el estudio realizado a lo largo de esta tesis doctoral parece revelar la existencia de una clara jerarquía en la regulación del proceso de nucleación de MTs en células RPE1 durante interfase. Así, en células tratadas con centrinona, la pérdida de los centriolos provoca que la capacidad del AG para nuclear MTs se duplique. En estas condiciones, los MTs crecen desde localizaciones discretas asociadas al AG y que presentan un elevado número de complejos proteicos basados en AKAP450-CDK5Rap2- γ -tubulina. Llamativamente, los complejos basados en PCNT que también se sitúan en el centrosoma se localizan y redistribuyen igualmente a estas posiciones, aunque por el contrario, no parecen contribuir a este incremento en los niveles de nucleación de MTs desde el AG. Estos datos sugieren por tanto que el centrosoma en interfase va a, en cierto modo, restringir el reclutamiento de estos complejos basados en PCNT (PCNT-CDK5Rap2- γ -tubulina) al AG y que dichos complejos van a ser no funcionales en esta localización, al menos durante esta fase del ciclo celular. Resultado que demuestra el papel dominante del centrosoma como MTOC celular.

Existencia de sitios de nucleación alternativos en el citoplasma: cMTOCs

Una vez establecida esta conclusión, la siguiente cuestión clave que se planteaba era cómo la célula respondía en términos de nucleación de MTs a la inhibición de dicha actividad desde sus dos principales MTOCs. Bajo estas condiciones (eliminación de AKAP450 y tratamiento con centrinona), la nucleación de MTs no se inhibió, sino que se trasladó desde estos MTOCs a ciertas localizaciones citoplásmicas que denominamos MTOCs citoplásmicos (cMTOCs). Sorprendentemente, y al contrario de lo que se podía esperar, dichos cMTOCs eran capaces de establecer y organizar una red de MTs completa capaz de ocupar la totalidad de la célula, es decir, iban a presentar todos los requerimientos estructurales y funcionales para la formación de MTs. En una primera interpretación, la aparición de estas estructuras parecía responder a una simple relocalización de los factores nucleadores de MTs dada la ausencia del andamiaje que el centrosoma proporcionaba para su reclutamiento. Sin embargo, al analizar en detalle la conformación de dichos elementos, observamos que, de todos los marcadores centrosómicos testados, sólo fuimos capaces de detectar la presencia de PCNT, CDK5Rap2 y γ -tubulina. Además, de forma más residual y esporádica también pudimos detectar la presencia de nineína (especialmente en las estructuras de mayor tamaño) que podría estar interaccionando con los distintos complejos reclutadores de γ -tubulina o con la propia PCNT de forma directa (Chen et al. 2014; Delgehyr, Sillibourne, and Bornens 2005). Sorprendentemente, estos MTOCs citoplásmicos carecían de CEP192, proteína de andamiaje que interacciona con PCNT y que, de acuerdo con datos previos (Joukov, Walter, and De Nicolo 2014), nosotros hemos descrito como dominante en el reclutamiento de γ -tubulina al centrosoma en interfase y por tanto clave en la nucleación de MTs desde este MTOC. Así, según nuestros datos, la formación de los cMTOCs no responde a una simple relocalización de los elementos presentes en el centrosoma, sino que parecen ser estructuras propias y específicas originadas únicamente al darse cierto tipo de condiciones celulares concretas (a pesar de compartir algunos elementos comunes con el centrosoma o el AG). Cabe destacar en este sentido que la eliminación de PCNT provoca la inhibición completa de la formación de dichas estructuras, indicando que la proteína desempeña un papel clave en la biogénesis de estos MTOCs alternativos. Así, de acuerdo con los datos previamente publicados que atribuyen a la PCNT un papel esencial en la formación y andamiaje del PCM (Lerit et al. 2015; Richens et al. 2015), nosotros proponemos que esa función estructural de la proteína podría estar igualmente afectando a la estabilidad y constitución de los MTOCs citoplásmicos. Cabe destacar que la presencia y actividad de estos cMTOCs no se observa en condiciones control a pesar de la existencia de un claro pool citoplásmico de las proteínas que los constituyen (PCNT, CDK5rap2 y γ -tubulina), lo cual parece responder a la existencia de algún tipo de regulación y control a nivel celular que permite la formación y posterior activación de dichos complejos.

Una situación similar se ha propuesto para el caso del AG, donde el reclutamiento de los complejos de AKAP450 vía GM130 podría estar restringiendo la unión de complejos funcionalmente activos a estas membranas. De hecho, el incremento del reclutamiento de PCNT y CDK5Rap2 al AG observado en células sin centrosoma seguramente responda a complejos proteicos formados tras la eliminación del centrosoma a partir de pool citosólico preexistente y que posteriormente son reclutados a la superficie del AG.

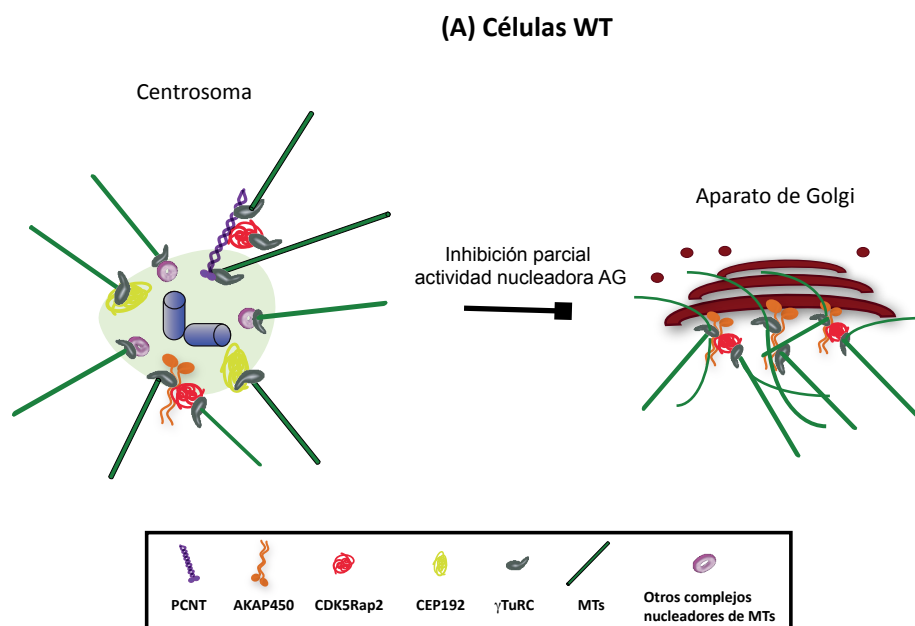
Varias líneas de investigación demuestran que estos focos de nucleación citoplásmica de MTs han sido previamente detectados en blastómeros de embriones de ratones (carentes de centriolos) así como en la mitosis de embriones de *Drosophila* tras la inactivación de los centrosomas (Hayward et al. 2014; Maro et al. 1986). A este respecto, estructuras nucleadoras de MTs acentriolares también han sido observadas en células humanas sin centrosoma carentes de la ubiquitin ligasa TRIM37 (Meitinger et al. 2016) (proteína implicada en la activación de p53 tras la pérdida del centrosoma). En este caso, sin embargo, todos estos focos de nucleación acentriolares contenían CEP192 y CEP152, pero carecían de γ -tubulina, PCNT y CDK5Rap2; por lo que existen diferencias estructurales esenciales con respecto a los cMTOCs descritos en este trabajo (Baumbach et al. 2015; Sir et al. 2013). Otras estructuras nucleadoras acentriolares completamente funcionales pero con una conformación estructural más lineal, también se han descrito en células carentes de centrosomas y de las proteínas AKAP450 y CAMSAP2 (Wu et al. 2016), por lo que parece que existe algún tipo de pluripotencialidad a nivel celular en este aspecto. En cualquier caso, estas observaciones demuestran la habilidad de las distintas proteínas del PCM para ensamblarse en diferentes complejos nucleadores de MTs cuando los principales MTOCs no están activos, otorgando a la propia célula una mayor plasticidad a la hora de establecer una compleja y adecuada red de MTs completamente funcional (especialmente en el caso de tejidos altamente diferenciados).

Como ya hemos indicado con anterioridad, de estudios previos del laboratorio, conocíamos que la nucleación de MTs desde el AG es completamente dependiente de AKAP450 (Rivero et al. 2009) mientras que en el caso de los cMTOCs dicho proceso requiere la presencia de PCNT (resultado obtenido en esta tesis), es decir, es una proteína esencial para la formación de MTs en dichas localizaciones. Ante estos datos, una cuestión emergente es porqué el centrosoma en interfase recluta complejos proteicos constituidos por estas dos proteínas si, cómo hemos observado en nuestros resultados, su contribución a la nucleación de MTs desde esta localización puede considerarse residual. En este sentido, nosotros proponemos que dicho reclutamiento responde a algún tipo de regulación por parte del centrosoma para el control de la totalidad de la red de MTs celular, control que llevaría a cabo por medio de dos mecanismos complementarios. Primero, mediante el reclutamiento de factores directamente implicados en el proceso de nucleación de MTs desde este sitio, tales como CEP192 y, en segundo lugar, por medio de la acumulación de factores responsables de la nucleación en otras localizaciones tales como complejos de PCNT, en el caso de la nucleación citoplásmica, o de AKAP450 para la nucleación dependiente del AG. Es decir, sugerimos que el centrosoma sería capaz de controlar el número total de MTs en la célula mediante la inhibición o regulación de la nucleación en el citoplasma (desde los cMTOCs o el propio ensamblaje espontáneo dependiente de γ -tubulina) y/o desde el AG. En apoyo a estas hipótesis, ya se habían descrito en la bibliografía mecanismos de inhibición de la nucleación citoplásmica dependientes del centrosoma en la mitosis de blastómeros de *C.elegans* (Zwicker et al. 2014). En esta misma línea, la idea de que la inhibición de una ruta de nucleación puede compensarse con la activación de mecanismos alternativos ya se había propuesto en ciertos procesos fisiológicos como el establecimiento del huso mitótico en embriones de *Drosophila* (Hayward et al. 2014) donde, en ausencia de centrosoma, la célula es capaz de activar un mecanismo dependiente de augmina que

dirige la nucleación de MTs. Sin embargo, nuestros datos apoyan la idea de que los diferentes MTOCs celulares no ocupan una posición equivalente dentro del mecanismo de regulación, sino que existe una cascada jerárquica, al menos en interfase, en la que el AG se sitúa bajo el control del centrosoma. Esta función del centrosoma como regulador principal de la nucleación de MTs en células humanas coincide con las observaciones obtenidas en experimentos con células de intestino diferenciadas llevadas a cabo en embriones de *C.elegans* (Yang and Feldman 2015). En este caso, las células al diferenciarse trasladan su actividad de nucleación de MTs a la superficie apical, pero el papel como MTOC del centrosoma siempre es dominante en condiciones concretas, siendo la proteína SPD-2 (ortólogo de CEP192) clave en dicho proceso.

Un resultado interesante, a la par que inesperado, fue que en condiciones en las que la nucleación de MTs se hallaba aparentemente inhibida por completo (ausencia de centrosomas, AKAP450 y PCNT), numerosos MTs individuales eran todavía capaces de originarse a lo largo de todo el citoplasma celular, dando finalmente lugar a una red completa de MTs aparentemente funcional. Es decir, que en ausencia de todas las estructuras tradicionalmente consideradas como MTOCs, la célula aún era capaz de generar un citoesqueleto de MTs por medio de un mecanismo que se ve notablemente afectado por la presencia de gatastatina (Chinen et al. 2015), lo que indica la implicación de γ -tubulina en tal proceso. Esta nucleación de MTs individuales desde localizaciones discretas en el citoplasma ya se había descrito como el principal mecanismo de generación de MTs endoplásmicos en las células del protonema de *Physcomitrella patens* (Nakaoka et al. 2015). Así, al menos en células humanas en interfase, nuestros resultados muestran que los MTs pueden ser nucleados desde γ TuRCs independientes en el citoplasma sin necesidad de que sean reclutados a localizaciones concretas siempre y cuando los MTOCs celulares se hallen inactivos.

El siguiente esquema propone un modelo de trabajo que resume nuestra idea de la jerarquía existente en la regulación y control de los diferentes MTOCs celulares y cómo ésta afecta a la organización y dinámica de la nucleación de MTs (Figura D1).



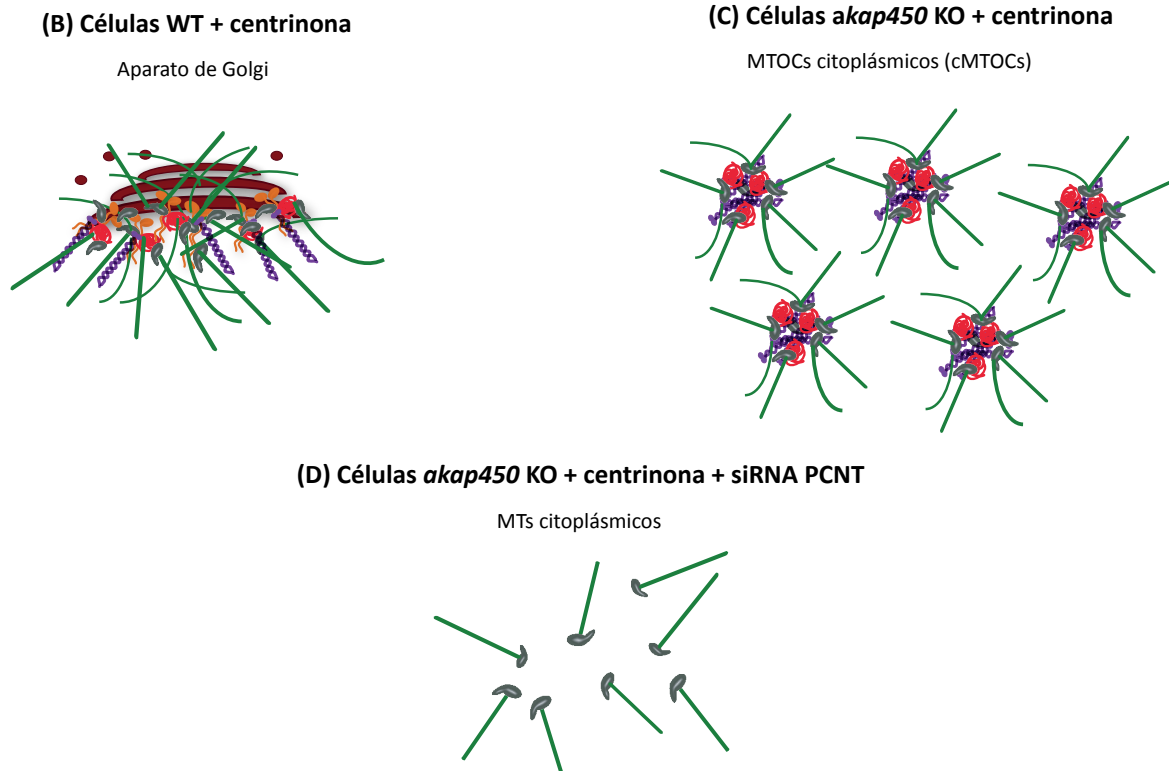


Figura D1. Representación esquemática de los MTOCs activos en las diferentes condiciones experimentales. (A) En condiciones normales tanto el centrosoma como el AG tienen capacidad de nuclear MTs. (B) En células desprovistas de centrosoma, el AG se convierte en el único MTOC activo, presentando una mayor capacidad de nucleación en comparación con la actividad observada en las células controles (A). Este incremento en la capacidad de nucleación podría deberse según nuestros resultados a un incremento en el reclutamiento de proteínas de unión a γ TuRC tales como AKAP450, CDK5Rap2. (C) Cuando los dos principales MTOCs celulares se encuentran inactivos (depleción de AKAP450 y tratamiento con centrinona) la nucleación de MTs no se inhibe, sino que se traslada desde estos MTOCs a ciertas localizaciones citoplásmicas que denominamos MTOCs citoplásmicos (cMTOCs). Estas nuevas estructuras se van a caracterizar por la presencia de CDK5Rap2, γ -tubulina y PCNT, siendo esta última un componente esencial para su conformación. (D) En ausencia de todas las estructuras que pueden ser consideradas como MTOCs (ausencia simultánea de AKAP450 y PCNT y tratamiento con centrinona) la célula aún es capaz de generar un citoesqueleto de MTs por medio de un mecanismo mediado por γ -tubulina. Es decir, los MTs van a poder ser nucleados desde γ TuRCs independientes en el citoplasma sin necesidad de que sean reclutados a localizaciones concretas siempre y cuando los MTOCs celulares se hallen inactivos.

Adaptación y regulación de la red de MTs durante la diferenciación celular: el porqué de la jerarquía entre MTOCs

Es conocido desde hace tiempo que, durante el mecanismo de diferenciación celular, la red de MTs experimenta un destacado proceso de reordenamiento y reorganización como consecuencia de una gran variedad de procedimientos entre los que destacan el tamponamiento de la actividad nucleadora del centrosoma o incluso la propia eliminación del mismo (Muroyama and Lechler 2017). Bajo estas condiciones, en la mayoría de los casos, tales como en neuronas, células de músculo esquelético o células β -pancreáticas; el establecimiento y mantenimiento de la red está asegurada por la actividad de las membranas del AG (Oddoux et al. 2013; Ori-McKenney, Jan, and Jan 2012; Zhu et al. 2015). A este respecto, los mecanismos específicos que subyacen a la pérdida de actividad nucleadora de MTs

por parte del centrosoma durante la diferenciación celular están lejos de ser comprendidos en detalle, pero un procedimiento común observado en varios tipos celulares es la redistribución o liberación de los componentes del PCM, especialmente aquellos implicados en mecanismos de nucleación tales como PCNT, CDK5Rap2, γ -tubulina o AKAP450. Una hipótesis atractiva podría ser que la liberación de estas proteínas del PCM desde la estructura del centrosoma no sólo se tradujera en la inactivación de éste como elemento nucleador, sino que también implicara la activación de la nucleación desde el AG tal y como nuestros resultados demuestran que ocurre en el caso de las células tratadas con centrinona. Cabe destacar, por ejemplo, que diversos estudios han identificado la presencia de PCNT en la superficie del AG de fibras de musculo esquelético, donde la nucleación de MTs se produce tanto desde ésta localización como a partir de la superficie de la envuelta nuclear (Gimpel et al. 2017; Oddoux et al. 2013). Así, las membranas del AG de células diferenciadas, al igual que aquellas carentes de centrosoma, acumulan estos factores reclutadores de γ -tubulina siendo de nuevo AKAP450 el componente esencial implicado en la nucleación de MTs, mientras que CDK5Rap2 y especialmente PCNT no presentan una influencia significativa. Estos datos sugieren por tanto que las células tratadas con centrinona, a pesar de tratarse de una condición no fisiológica, son capaces de mimetizar el comportamiento a nivel de regulación y organización del citoesqueleto de MTs de células de tejidos diferenciadas en las que el centrosoma aparece inactivado de forma natural. La posibilidad de que la nucleación asociada al AG observada en estas condiciones pueda de algún modo ser también modulada dando lugar a la formación de los MTOCs citoplásmicos acentriolares (cMTOCs) es todavía una simple especulación y no hay referencias bibliográficas que lo corroboren. Sin embargo, parece claro, que la plasticidad y dinamismo existente en el mecanismo de nucleación de MTs demostrado en este trabajo, van a contribuir notablemente a facilitar la rápida y correcta reordenación del citoesqueleto celular a lo largo del proceso de diferenciación. El hecho de por qué la actividad nucleadora del centrosoma debe verse alterada durante dicho mecanismo para potenciar otras localizaciones es otro asunto aún por explorar y que requiere de estudios adicionales.

Nuevas perspectivas de la función del centrosoma en células animales: Control de la densidad de MTs.

Tal y como se ha discutido con anterioridad, nuestros resultados indican que el mecanismo de nucleación de MTs es un proceso que posee un claro control jerarquizado en el que el centrosoma se sitúa como principal elemento regulador. Así, las alteraciones en la estabilidad del centrosoma (tratamiento con centrinona o amplificación) estimulan o reprimen notablemente la nucleación de MTs asociada al AG, mientras que por el contrario, la inhibición de ésta (vía eliminación de AKAP450) no parece afectar de forma significativa a la actividad nucleadora del centrosoma. Además, la aparición de nucleación citoplásmica desde los cMTOCs requiere la inhibición de la actividad nucleadora tanto del centrosoma como del AG, demostrando la existencia de una regulación ordenada a nivel intracelular.

La configuración de la red completa de MTs de una célula individual está caracterizada y definida tanto por el mecanismo de organización como por el número total de MTs que la componen. En este sentido, un resultado especialmente interesante fue el hecho de que tanto en la células sin centrosoma,

en las que el AG se convierte en el único MTOC activo, como en los clones mutantes de *akap450* tratados con centrinona, en los que todos los MTs se originan a partir de los cMTOCs, la densidad de MTs es dos veces mayor que en comparación con las células controles. Estos datos parecen indicar que el centrosoma no sólo es capaz de controlar la distribución espacial de la actividad de nucleación de MTs, sino que además, podría mantener un número constante de MTs en la célula. Es decir, tendría la habilidad de mantener una densidad de MTs fija por medio de la inactivación de la capacidad de nucleación desde otros MTOCs alternativos.

Estos resultados planteaban la duda de si el incremento en el número de MTs que se observaba se debía a una mayor expresión de α - y β -tubulina en respuesta a la ausencia del centrosoma o si por el contrario, era consecuencia de un incremento en la capacidad de reclutar heterodímeros por parte del MT en nucleación. Es decir, había que diferenciar si la célula estaba generando más proteína *de novo* o si lo que se estaba potenciando era la capacidad de ésta para activar complejos α/β -tubulina ya presentes en el citoplasma. En este sentido, nuestros datos desvelaron que no existía un incremento específico de la cantidad de α - o β -tubulina comparada con el contenido total de proteínas de la célula, lo que indicaba que en este mecanismo concreto lo que se estaba viendo afectado de forma directa era el equilibrio heterodímero/polímero esencial en la formación de MTs. Es decir, se estaba incrementando la capacidad del MT de incorporar moléculas de α/β -tubulina con mayor facilidad.

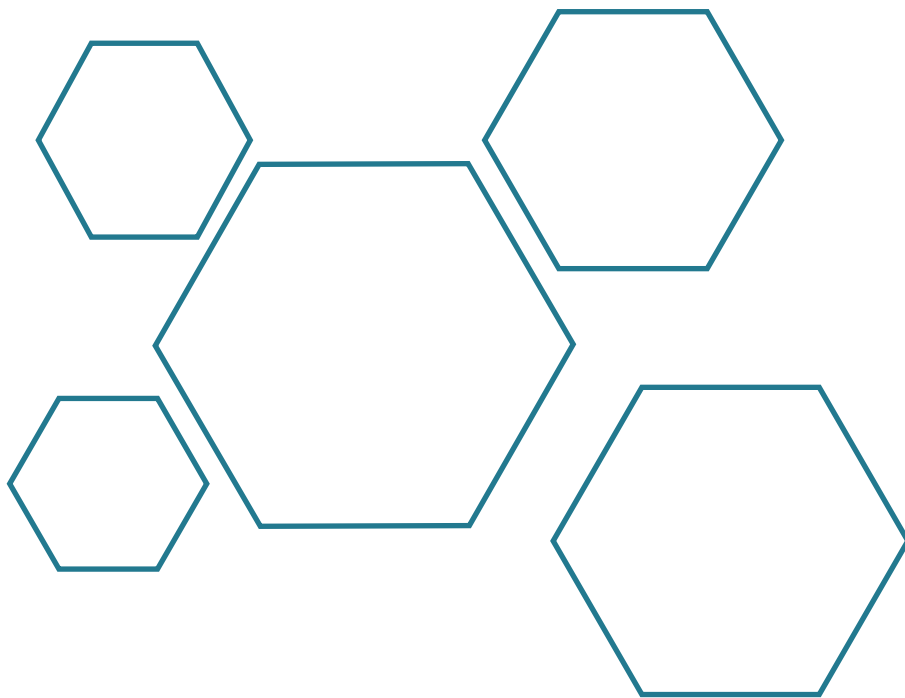
Sorprendentemente, este fenotipo de incremento de la densidad de MTs presente en todos los casos en los que el centrosoma se hallaba inactivo, no se produjo para el caso de células sin centrosoma que adicionalmente carecían de PCNT (uso de centrinona en células *pcnt* KO), apuntando de nuevo a la idea de que la PCNT pudiera presentar un papel adicional en el control global de la nucleación de MTs. Así, en conjunto, nuestros datos muestran un nuevo papel del centrosoma en el fino control del número total de MTs presente en las células en interfase mediante la regulación de la cantidad total de tubulina disponible para ser nucleada.

Curiosamente, esta novedosa función del centrosoma parece afectar notablemente a la arquitectura celular. A este respecto, no observamos alteraciones significativas en lo que a morfología celular se refiere en las condiciones de ausencia de centrosoma, pero ciertos parámetros tales como el volumen celular, el área de la célula o la morfología del núcleo sí presentaban perturbaciones llamativas. Este incremento de volumen y área celular, asociado al incremento del número de MTs, correlaciona con un aumento en la capacidad de propagación celular presente en condiciones de ausencia de centrosoma, lo que sugiere que la capacidad de adhesión de la célula al sustrato es probablemente dependiente de la cantidad total de MTs existentes. Hipótesis que encaja perfectamente con la idea de que los MTs controlan la dinámica reguladora de las adhesiones focales (Etienne-Manneville 2013). Los mecanismos por los que la célula es capaz de sensar su propia forma y tamaño es una cuestión aún sin resolver y, en función de los modelos celulares empleados, destacan dos hipótesis de manera notoria a) una basada en la dinámica de estructuras dependientes de actina (Farina et al. 2016) y b) otra centrada en la propia red de MTs (Minc, Burgess, and Chang 2011). En este sentido, existen numerosas evidencias relativas a una regulación conjunta del citoesqueleto de actina y de MTs a distintos niveles celulares, incluyendo el propio centrosoma (Farina et al. 2016). Además, numerosas quinasas, proteasas y otros

factores de señalización se localizan o interaccionan directamente con el centrosoma, apoyando la idea de que éste podría actuar como un elemento central en mecanismos de señalización celular (Arquint, Gabryjonczyk, and Nigg 2014). Esto permitiría explicar que la eliminación del centrosoma tenga efectos directos en diversos aspectos de la actividad celular más allá de los directamente asociados a la capacidad de nucleación de MTs.

En nuestra opinión, los resultados obtenidos presentan un gran interés ya que nos proporcionan una visión novedosa del papel del centrosoma en células humanas en interfase así como de su implicación en el control y regulación de la plasticidad de la red de MTs. En este sentido, nuestros datos muestran que, además de su papel como elemento nucleador de MTs, el centrosoma también va a controlar la organización de la red de MTs tamponando la nucleación de MTs asociada al AG y suprimiendo dicha actividad en el citoplasma celular, lo que en definitiva limita la generación de MTs en general y le permite actuar a modo de sensor del conjunto del citoesqueleto celular.

CONCLUSIONES



Primera. Las proteínas implicadas tradicionalmente en el reclutamiento de complejos γ TuRC no son esenciales para la nucleación de MTs desde el centrosoma en interfase; mientras que sí van a controlar esta función en el AG y el citoplasma.

Segunda. En el caso del centrosoma, CEP192 parece desempeñar un papel dominante en la capacidad de nucleación de MTs; siendo responsable junto con el resto de proteínas reclutadoras de γ TuRCs (AKAP450, CDK5Rap2 y PCNT) del 50% de su actividad como principal MTOC celular.

Tercera. Durante interfase, los MTs pueden ser generados desde una gran variedad de MTOCs cuya actividad está regulada de manera jerárquica siendo el centrosoma el elemento dominante.

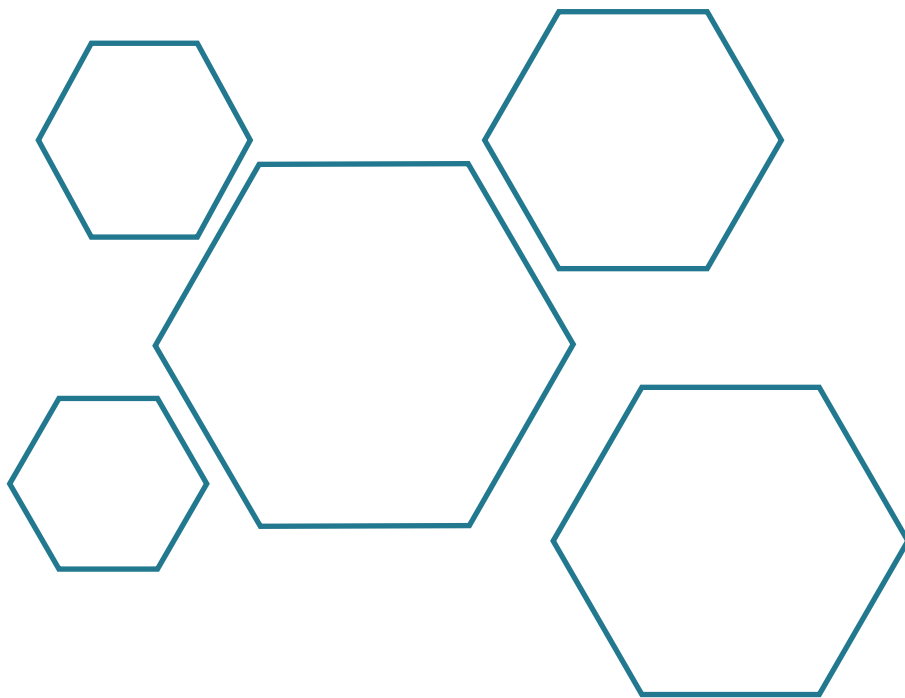
Cuarta. La inhibición de la nucleación de MTs desde el AG no afecta a la actividad nucleadora del centrosoma; mientras que modificaciones en el número de centrosomas vía centrinona sí afecta a la actividad del AG como MTOC. En ausencia de centrosomas, la capacidad nucleadora del AG se incrementa notablemente gracias al reclutamiento de receptores de γ TuRCs a la superficie del mismo.

Quinta. En ausencia de actividad nucleadora desde el centrosoma y el AG, los MTs son nucleados desde agregados citoplásmicos denominados MTOCs citoplásmicos y que son capaces de formar una completa y densa red de MTs. La PCNT constituye el andamio estructural esencial para la formación de estos cMTOCs.

Sexta. Cuando todos los MTOCs celulares se encuentran inactivos, la célula es capaz de formar MTs individuales desde el citoplasma mediante un mecanismo dependiente de γ -tubulina. Esta nucleación tiene capacidad para generar un citoesqueleto completo.

Séptima. La pérdida del centrosoma incrementa el número de MTs en la célula, independientemente desde donde estén siendo nucleados. Así, el centrosoma regula negativamente la actividad de otros MTOCs alternativos (AG y cMTOCs), limitando el número total de MTs presentes en la célula en interfase. La pericentrina desempeña un papel esencial en dicha regulación, actuando a modo de coordinador global del conjunto del proceso de nucleación entre los diferentes MTOCs.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES

1. Líneas celulares

Durante la realización de este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

Línea Celular	Especie	Origen/Características	Medio Cultivo	Procedencia
hTERT-RPE1	Humana	Epitelio pigmentario de retina. No cancerosa	DMEM/F12	ATCC (ATCC® CRL-4000™)
HeLa	Humana	Epitelio procedente de carcinoma de cervix	DMEM	Cedida por Dr. M. Bornens (Institute Curie, Paris , Francia)
MCF10A	Humana	Epitelio procedente de glándula mamaria. No cancerosa	DMEM/F12	Cedida por Dr. A. López Rivas (CABIMER, Sevilla)
hTERT-RPE1-FR/TO-GT-GFP	Humana	Epitelio pigmentario de retina. No cancerosa. Expresa de manera constitutiva los 81 aa de la región N-terminal de la proteína β 1,4-galactosiltransferasa fusionada a GFP.	DMEM/F12	Generada previamente en el laboratorio (Hurtado et al. 2011)

2. Reactivos

Las siguientes drogas y reactivos se usaron a las concentraciones que a continuación se indican:

Reactivo	Descripción	Concentración	Referencia
Nocodazole	Compuesto que provoca la despolimerización de los MTs de la célula	10 μ M	Sigma Ref. M1404
Yoduro de Propidio	Agente intercalante de ADN y de ARN de doble cadena utilizado para medir el contenido de ADN en citometría de flujo	40 μ g/ml	Sigma Ref. P4170
ARNasa	Enzima que cataliza la hidrólisis de ARN	100 μ g/ml	Sigma Ref. R6513
Ampicilina	Antibiótico de selección	100 μ g/ml	Sigma Ref. A9518
Kanamicina	Antibiótico de selección	50 μ g/ml	Sigma Ref. K1377

Espectinomicina	Antibiótico de selección	10 µg/ml	Sigma Ref. S4014
DAPI	Colorante fluorescente que se usa para teñir el ADN	1 µg/ml	Roche Ref. 10236276001
Centrinona	Inhibidor reversible de la quinasa PLK4	125 nM	Cedido por K. Oegema y A. Siau (Instituto Ludwig para la investigación del Cáncer, La Jolla, CA)
Gatastatina	Inhibidor de γ-tubulina	30 µM	Cedido por Dr. T. Usui (Universidad de Tsukuba, Japón)
Azul Coomassie	Colorante empleado en bioquímica para la tinción de proteínas en geles de electroforesis	3 g/L	Sigma Ref. B0149

3. Anticuerpos

3.1 Anticuerpos primarios

A continuación, se detallan los anticuerpos primarios utilizados, indicando su origen y procedencia. También se indican las diluciones usadas para inmunofluorescencia (IF) en células fijadas en metanol a -20°C y para *Western-Blot* (WB):

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Procedencia	IF	WB
Anti-α-Tubulina	α-Tubulina	Ratón	Sigma Ref. T6199	1:2000	1:5000
Anti-α-Tubulina	α-Tubulina	Conejo	Abcam Ref. 18251	1:2000	1:10000
Anti-α-Tubulina	α-Tubulina	Humano	Institute Curie, Paris (Francia)Ref. A-R-H#02	1:10	-
Anti-β-Tubulina	β-Tubulina	Humano	Institute Curie, Paris (Francia)Ref. A-R-H#23	-	1:100
Anti-GFP	GFP	Conejo	ICL Ref. RGFP-45A-Z	1:10000	1:1000
Anti-GFP	GFP	Ratón	Roche Ref. 11814460001	1:10000	1:1000
Anti-GFP	GFP	Humano	Institute Curie, Paris (Francia) Ref. A-R-H#11	1:50	-
Anti-GFP	GFP	Conejo	Institute Curie, Paris (Francia) Ref. A-R-H#18	1:50	-
Anti-GM130	GM130	Conejo	Abcam Ref. 40881	1:6000	1:10000

Anti-GM130	GM130	Ratón	BD Biosciences Ref. 610822	1:500	1:500
Anti-GM130	GM130	Conejo	Dr.Y.Misumi, Fukuoka University, Japan	1:16000	-
Anti-Giantina	Giantina	Humano	Institute Curie, Paris (Francia) Ref. A-R-H#03	1:250	-
RM130	GMAP210	Conejo	Generado previamente en el laboratorio (Infante et al. 1999)	1:50000	1:5000
Suero RN	GMAP210	Humano	Generado previamente en el laboratorio (Infante et al. 1999)	1:2000	-
Suero HG	Golgina245	Humano	Dr. M. Bornens Institute Curie, Paris (Francia)	1:6000	-
A24	AKAP450	Conejo	Dr. M. Bornens Institute Curie, Paris (Francia)	1:20000	1:5000
CTR433	CTR433	Ratón	Dr. M. Bornens Institute Curie, Paris (Francia)	1:10	-
CTR433	CTR433	Humano	Dr. M. Bornens Institute Curie, Paris (Francia)	1:100	-
Anti-AKAP450 (7/AK)	AKAP450	Ratón	BD Biosciences Ref. 611518	1:300	1:100
Anti-AKAP9 (Av)	AKAP450	Conejo	Aviva Systems Biology Ref. ARP39871_P050	1:100	1:100
Anti-AKA450 (Ct-AK)	AKAP450	Cabra	MYBiosource Ref. MBS420313	1:500	1:500
Anti-PCNT (CoV)	PCNT	Conejo	Covance Ref. PRB-432C	1:20000	-
Anti-PCNT (Abc-M)	PCNT	Ratón	Abcam Ref.mAbc 28144	1:3000	-
Anti-PCNT (Abc-R)	PCNT	Conejo	Abcam Ref. ab4448	1:40000	1:1000
Anti-PCNT (Ct-PCNT)	PCNT	Conejo	Biomatik Ref. CAU23943	1:500	-
Anti-CDK5Rap2 (Mi)	CDK5Rap2	Conejo	Millipore Ref. 06-1398	1:2000	1:2500
Anti-CDK5Rap2 SC3-1	CDK5Rap2	Conejo	Generado durante el presente trabajo (ver apartado 8. de Materiales y Métodos)	1:1000	1:500

Anti-CDK5Rap2 SC3-2	CDK5Rap2	Conejo	Generado durante el presente trabajo (ver apartado 8. de Materiales y Métodos)	1:1000	-
Anti- γ -Tubulina (GTU88)	γ -Tubulina	Ratón	Sigma Ref. T6557	1:1000	1:1000
Anti-Nineína	Nineína	Conejo	Dr. M. Bornens Institute Curie, Paris (Francia)	1:8000	1:1000
Anti-Nineína	Nineína	Humano	Institute Curie, Paris (Francia) Ref. A-R-H#28	1:10	-
Anti-Centrobina	Centrobina	Conejo	Sigma-Aldrich Ref. HPA0233321	1:500	-
Anti-CAP350 clon G8	CAP350	Ratón	Generado previamente en el laboratorio (Gavilan et al. 2015)	1:5000	-
Anti-CAP350	CAP350	Cabra	Dr. E. Nigg , Biozentrum University of Basel, Switzerland	1:2500	-
Anti-CP110	CP110	Conejo	ProteinTech Ref. 12780-1-AP	1:1000	-
Anti-centrina	Centrina 2	Conejo	Millipore Ref. 04-1624	1:1500	-
Anti-EB1	EB1	Ratón	BD Biosciences Ref. 610534	1:500	-
Anti-Hsp70	Hsp70	Ratón	Abcam Ref. ab6535	-	1:10000
Anti-PCM1	PCM1	Conejo	Bethyl laboratories Ref. A301-149A-T	1:100	-
Anti-CEP63	CEP63	Conejo	Millipore Ref.06-1292	1:1000	-
Anti-CNAP-1	CNAP-1	Ratón	Santa Cruz Biotechnology Ref. sc-390540	1:500	-
Anti-CEP135	CEP135	Conejo	Abcam Ref. ab75005	1:500	-
Anti-Cep192	CEP192	Conejo	Dr.L.Pelletier Lunenfeld- Tanenbaum Research Institute, Toronto, Canadá.	1:2000	1:1000

3.2 Anticuerpos secundarios

A continuación, se enumeran los anticuerpos secundarios utilizados indicando su origen y procedencia:

Anticuerpo	Origen	Fluorocromo	Procedencia
Anti-Ratón IgG (H+L)	Burro	<i>Alexa Fluor 488</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 715-545-150
Anti-Conejo IgG (H+L)	Burro	<i>Alexa Fluor 488</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 711-545-152
Anti-Humano IgG (H+L)	Burro	<i>DyLight 488</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 709-545-149
Anti-Conejo IgG (H+L)	Burro	<i>Cy3</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 711-165-152
Anti-Ratón IgG (H+L)	Burro	<i>DyLight 549</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 715-505-151
Anti-Ratón IgG (H+L)	Burro	<i>DyLight 594</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 715-585-150
Anti-Conejo IgG (H+L)	Burro	<i>DyLight 594</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 711-585-152
Anti-Ratón IgG (H+L)	Burro	<i>Alexa Fluor 647</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 715-605-150
Anti-Conejo IgG (H+L)	Burro	<i>DyLight 649</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 711-605-152
Anti-Humano IgG (H+L)	Cabra	<i>Alexa Fluor 633</i>	Invitrogen Ref. A-21091
Anti-Humano IgG (H+L)	Burro	<i>Alexa Fluor 647</i>	Jackson ImmunoResearch Ref. 709-605-149

Secundarios blot

Anticuerpo	Referencia
ECL Anti- <i>Mouse</i> IgG, Amersham;	Ref. NA931VS;
ECL Anti- <i>Rabbit</i> IgG, Amersham	Ref. NA934VS;
Anti- <i>goat</i> IgG-HRP,	Santa Cruz Biotechnology; Ref. sc-2020;
Anti-human IgG-HRP,	Santa Cruz Biotechnology; Ref. sc-2453).

4. Plásmidos

La siguiente tabla resume los plásmidos ya existentes empleados en este trabajo, así como sus características más destacadas:

Plásmido	Características	Referencia
pRcCMV-Cep215	Kanamicina ^r . Plásmido que contiene el cDNA completo de la proteína CDK5Rap2 (Cep215)	Addgene Ref. 41152
pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461)	Ampicilina ^r . Vector que contiene el gen correspondiente a la proteína <i>Cas9-nickase</i> , empleado para generar líneas estables mutantes mediante el sistema CRISPR/Cas9. También contiene un promotor hU6, un par de sitios BbsI para la clonación de una secuencia de ARN guía y una secuencia que codifica un <i>scaffold</i> de ARN.	Addgene Ref. 48140
pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromicina	Ampicilina ^r . Vector que contiene un promotor hU6, un par de sitios BsaI para la clonación de una secuencia de ARN guía y una secuencia que codifica un <i>scaffold</i> de ARN. Empleado para generar líneas estables mutantes mediante el sistema CRISPR/Cas9	Addgene Ref. 51133
pMAB36-6xHis-LYTAG	Espectinomycin ^r . Vector de transcripción diseñado para la expresión a partir de señales de traducción bacterianas ubicadas dentro de un inserto de clonación. Permite la purificación de proteínas de fusión mediante el sistema de resinas C-LYTAG.	Biomedal
peGFP-C2-AK1	Ampicilina ^r . Plásmido basado en peGFP-C2 que contiene el fragmento AK1 (aminoácidos 1 al 1029) de AKAP450 clonado en fusión con la proteína GFP.	Generado previamente en el laboratorio (Hurtado et al. 2011).
peGFP-C2-AK2	Ampicilina ^r . Plásmido basado en peGFP-C2 que contiene el fragmento AK2 (aminoácidos 933 al 1802) de AKAP450 clonado en fusión con la proteína GFP.	Generado previamente en el laboratorio (Hurtado et al. 2011).
peGFP-C2-AK3	Ampicilina ^r . Plásmido basado en peGFP-C2 que contiene el fragmento AK3 (aminoácidos 1708 al 2864) de AKAP450 clonado en fusión con la proteína GFP.	Generado previamente en el laboratorio (Hurtado et al. 2011).
peGFP-C2-AK4	Ampicilina ^r . Plásmido basado en peGFP-C2 que contiene el fragmento AK4 (aminoácidos 2875 al 3899) de AKAP450 clonado en fusión con la proteína GFP.	Generado previamente en el laboratorio (Hurtado et al. 2011).

pCMV-tdTomato-Centrin2	Kanamicina ^r . Plásmido basado en pCMV-tdTomato que contiene el cDNA correspondiente a la proteína Centrina 2.	Cedido por Dr. T. Stearns. (Universidad de Stanford, EE.UU.)
------------------------	---	---

En la siguiente tabla se muestran los plásmidos construidos durante este trabajo indicando sus características principales:

Plásmido	Características
pMAB36-CDK5Rap2 (650-900)	Plásmido basado en el pMAB36-6xHis-LYTAG que contiene un fragmento de CDK5Rap2 (aminoácidos 650 al 900) clonado en las dianas de restricción EcoRV-KpnI. Este fragmento de CDK5Rap2 fue amplificado por PCR empleando como ADN molde el plásmido <u>pRcCMV-Cep215 (Addgene: 41152)</u> . Empleado para expresar el fragmento y permitir su posterior purificación para la generación del anticuerpo.
pMAB36-CDK5Rap2 (1400-1500)	Plásmido basado en el pMAB36-6xHis-LYTAG que contiene un fragmento de CDK5Rap2 (aminoácidos 1400 al 1500) clonado en las dianas de restricción EcoRV-KpnI. Este fragmento de CDK5Rap2 fue amplificado por PCR empleando como ADN molde el plásmido <u>pRcCMV-Cep215 (Addgene: 41152)</u> . Empleado para expresar el fragmento y permitir su posterior purificación para la generación del anticuerpo.
pIFA1	Plásmido basado en el PX461, generado mediante la clonación de un fragmento de ADN de 409 pb procedente del plásmido pGL3-U6-sgRNA- PGK-puromicina en el sitio XbaI del plásmido PX461, permitiendo expresar en un único plásmido tanto la proteína Cas9n como dos ARNs guías.
Plásmido pIFA1-ARNg-AKAP450 (pIFA2)	Plásmido basado en el pIFA1. Las parejas de oligos que conforman los ARN guías dirigidos frente al exón 2 de akap9 fueron clonadas en los sitios BbsI y BsaI del vector pIFA1.
Plásmido pIFA1- ARNg-CDK5Rap2 (pIFA3)	Plásmido basado en el pIFA1. Las parejas de oligos que conforman los ARN guías dirigidos frente al exón 1 de cdk5rap2 fueron clonadas en los sitios BbsI y BsaI del vector pIFA1.
Plásmido pIFA1- ARNg-PCNT (pIFA4)	Plásmido basado en el pIFA1. Las parejas de oligos que conforman los ARN guías dirigidos frente al exón 5 de pericentrina fueron clonadas en los sitios BbsI y BsaI del vector pIFA1.
Plásmido pIFA1- ARNg-Cep192	Plásmido basado en el pIFA1. Las parejas de oligos que conforman los ARN guías dirigidos frente al exón 5 de cep192 fueron clonadas en los sitios BbsI y BsaI del vector pIFA1.

MÉTODOS

5. Cultivos celulares

Las células **HeLa** se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma; Ref. D5796), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Sigma; Ref. F7524), L-glutamina 2 mM (Sigma; Ref. G7513), estreptomina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml (Sigma; Ref. P0781). Las células **hTERT-RPE1** se cultivaron en medio DMEM/F12 (Sigma; Ref. D8437) suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, estreptomina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml. Las **MCF10A** se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal de caballo al 10% (GIBCO; Ref. 16050122), EGF 20 ng/ml (Pepro Tech; Ref. 100-15), hidrocortisona 0,5 µg/ml (Sigma; Ref. H0888), insulina 10 µg/ml (Sigma; Ref. I5500), L-glutamina 2 mM, estreptomina 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml y toxina colérica 0,1 ng/ml (Biomol; Ref. P9289). Todos los cultivos se mantuvieron en una atmósfera húmeda, a 37 °C, y con CO₂ al 5%.

6. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

6.1 ADN

6.1.1 Separación de fragmentos de ADN: Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando geles de agarosa preparados en tampón TAE 1% a una concentración de 0,8-2% (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos a analizar. A los geles se les añadió bromuro de etidio a una concentración final de 5 µg/ml. La electroforesis se realizó en sistemas horizontales "*Mini Gel Electrophoresis System*" (Labnet; Ref. 0100834). Para determinar el tamaño de los fragmentos se empleó un marcador de ADN comercial (1 kb *DNA Ladder*. Invitrogen; Ref. 15615-016).

6.1.2 Purificación de plásmidos de bacterias

- Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala (Miniprep): Se utilizó el kit comercial "*Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit*" (ZymoResearch; Ref. D4020).
- Purificación de ADN plasmídico a mediana escala (Midiprep): Se utilizó el *kit* comercial "*QIAGEN® Plasmid Midi Kit*" (QIAGEN; Ref. 12143).

En ambos casos, se siguieron las instrucciones del fabricante.

6.1.3 Purificación de ADN genómico

Para la obtención de ADN genómico se utilizó el kit comercial "*PureLink™ Genomic DNA Mini Kit*" (Invitrogen; Ref. K1820-01) según el protocolo del fabricante.

La concentración de ADN obtenida en los dos apartados anteriores se estimó realizando diluciones y midiendo en el Nanodrop (*NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer*). La integridad del ADN se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa.

6.1.4 Amplificación de secuencias de ADN: PCRs

En función del tamaño del fragmento a amplificar, las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo utilizando la enzima “*GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase*” (Promega) o “*Q5® High-Fidelity DNA Polymerase*” (New England Biolabs) siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante. El termociclador empleado fue el *Mastercycler* personal de *Eppendorf*.

6.1.5 Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa

Para la extracción de ADN de la agarosa se usó el kit comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” (QIAGEN; Ref. 28704) siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.1.6 Digestión y ligación de fragmentos de ADN

Para la digestión de fragmentos de ADN se usaron endonucleasas de restricción (Takara; Amersham Biosciences o New England Biolabs). Tanto en el caso de digestiones simples como dobles, se emplearon los tampones de restricción suministrados por las casas comerciales siguiendo las recomendaciones de las mismas. Para la ligación de distintos fragmentos de ADN se usó la enzima *T4 DNA Ligase* (Invitrogen; Ref. 15224).

6.1.7 Transformación de ADN

Las bacterias competentes se transformaron por protocolo de choque térmico. Se mezclaron 50 µl de bacterias (*Escherichia coli* cepa DH5α, obtenidas en el servicio de Organismos Modelo de CABIMER) con el ADN a transformar. La mezcla se incubó primero 30 minutos en hielo y luego 45 segundos a 42°C. Seguidamente se añadió 1 ml de LB y se incubó a 37°C durante 45-90 minutos (dependiendo de la resistencia del plásmido). Transcurrido este tiempo, las células se sembraron en medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado para la selección de aquellas bacterias que hubieran incorporado el plásmido.

6.1.8 Secuenciación

La secuenciación de fragmentos de ADN la realizó la empresa GATC (Colonia, Alemania) siguiendo las recomendaciones de ésta en cuanto a concentración de ADN y oligos empleados.

6.2 ARN

6.2.1 Purificación y aislamiento de moléculas de ARN

El aislamiento de ARN total se llevó a cabo empleando el kit comercial “*RNeasy® Mini Kit*” (QIAGEN®; Ref. 74104) siguiendo las indicaciones del fabricante e incluyendo un paso de digestión con DNasa I para evitar posibles contaminaciones con ADN.

6.2.2 Obtención de ADN complementario (cDNA)

El ADN complementario o cDNA se obtuvo a partir de 3 µg de ARN total empleando hexámeros aleatorios de nucleótidos y el kit “*SuperScript III Reverse Transcriptase*” (Invitrogen®) siguiendo las

indicaciones del fabricante. Estos cDNAs se diluyeron en agua estéril y se emplearon como molde para la amplificación mediante RT-qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real).

6.2.3 PCRs cuantitativas a tiempo real o (RT-qPCR)

Las PCR a tiempo real se llevaron a cabo empleando el sistema Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). La expresión relativa de cada uno de los ARN mensajeros analizados (cDNA) se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ empleando la expresión del gen GAPDH como control endógeno. Los oligos diseñados para la determinar la expresión relativa de los distintos genes fueron:

Gen	Nombre del oligo	Secuencia
akap450	AK1 FW	5'- AGAAGACTTCACAATGCAAATTAG -3'
	AK1 RV	5'- TGATTGTCTCCTTTTCCTGTATTTC-3'
	AK2 FW	5'- GAACACTATGTTGCCGTTCAAGT -3'
	AK2 RV	5'- TGCTAGCTCAGGAATTGAGGA -3'
	AK3 FW	5'- GAAATTAAGTGGCCAGCAAGG -3'
	AK3 RV	5'- CCCTGTCAGCTCAGCATTTT -3'
pcnt	PC1 FW	5'- CAGAACAGCGTGGGATCTTC -3'
	PC1 RV	5'- TCTCCAGGTCAGTAATGGCAA -3'
	PC2 FW	5'- TCCACGTGAAGGAAGACTG -3'
	PC2 RV	5'- GAAGGCATCTTGTTCCGCAC -3'
	PC3 FW	5'- GGCTTCTCACCAGCTTCACC -3'
	PC3 RV	5'- ACTTCAGCTCCTCCAACGTG -3'
cdk5rap2	C5R1 FW	5'- CACGGAACATGAAGGACTTTG -3'
	C5R1 RV	5'- TCCTGTTGCATTCTTCTCTCA -3'
	C5R2 FW	5'- TTCTTCTCACGAGACCAGAAGC -3'
	C5R2 RV	5'- TTTCTCAAAGTTCGAATTCCTGT -3'
GAPDH	GAPDH-FW	5'- GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3'
	GAPDH-RV	5'- GTTGAGGTCAATGAAGGGGTC -3'

Como Master Mix para la PCR se empleó *iTaq SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7. Análisis de proteínas

7.1 Purificación y aislamiento de proteínas

Para la extracción de proteínas, las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 500 g durante 3 minutos. Los precipitados de células obtenidos se lavaron con PBS1X (*phosphate buffered saline*, NaCl

136mM, KCL 2,7 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 10mM y K_2HPO_4 1,4mM) y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Para la lisis celular se utilizó tampón Tris-HCl (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) pH 7,5 al que se añadió NP40 al 1%, una mezcla de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor cocktail*. Sigma; Ref. P8340) (1:100) y PMSF (1mM). Después de añadir el tampón de lisis, las células se incubaron 20 minutos en hielo, y seguidamente, 3 minutos a 37°C. El lisado se centrifugó a 13000 g durante 30 minutos a 4°C. Así se obtuvieron dos fracciones, el sobrenadante o fracción soluble (FS) y el pellet o fracción insoluble (FI). Para experimentos de electroforesis y WB, las fracciones se sometieron a tres pulsos de sonicación de 8 segundos (amplitud = 10%; *Branson Digital Sonifier 450*) y se hirvieron durante 5 minutos en presencia de tampón *Sample Buffer* (Tris-HCl 0,0625 M, glicerol al 10%, SDS al 2% y β -mercaptoetanol al 5%) pH 6,8. En el caso de que fuera necesario obtener fracciones totales, tras el primer lavado de los precipitados de células con PBS1X, éstos se sonicaron e hirvieron a 100°C durante 5 minutos en presencia de tampón *Sample Buffer* (Tris-HCl 0,0625 M, glicerol al 10%, SDS al 2% y β -mercaptoetanol al 5%) pH 6,8 (tal y como se ha indicado en el caso anterior).

7.2 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Para medir la concentración de proteínas de los extractos celulares se empleó el método Bradford (Sigma; Ref. B6916) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos los extractos se ajustaron a una concentración final de proteínas de 3 mg/ml.

7.3 Electroforesis de proteínas en gel de bis-acrilamida e inmunoblot (WB)

La electroforesis se realizó según el procedimiento estándar (Laemmli, 1970). Se usaron geles de poliacrilamida de entre el 6-12%, según el peso molecular de las proteínas estudiadas.

La transferencia de las proteínas de los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa se realizó con la unidad *TRANS-BLOT SD SEMY-DRY TRANSFER CELL* (BIO-RAD, transferencia semi-seco) para proteínas de tamaño inferior o igual a 200 KDa y la unidad *MINI TRANS-BLOT CELL* (BIO-RAD, transferencia húmeda) para proteínas de tamaño mayor a 200 KDa. El tiempo de la transferencia se ajustó según el tamaño de las proteínas analizadas en cada caso.

De forma previa a la incubación con los anticuerpos específicos en cada caso, las membranas se saturaron durante 1 hora a 37°C (o toda la noche a 4°C) en agitación con tampón TBS-Tween al 0,1% y leche (leche en polvo desnatada) al 0,5% a pH 7,4-7,6. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante 1 hora a 37°C en el mismo tampón. A continuación, las membranas se lavaron durante 15 minutos (3 lavados de 5 minutos cada uno) en tampón TBS-Tween al 0,1%. La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó en este tampón durante 45 minutos a 37°C. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (incluidos en la tabla de anticuerpos secundarios). Tras la incubación, las membranas se lavaron 3 veces de nuevo y se revelaron usando una mezcla de luminol y peróxido de hidrógeno (Inmobilon western chemiluminiscent HRP substrate; Ref. WBKLS0500); reactivo ECL.

Para el análisis cuantitativo de las bandas de WB, se midió la densidad óptica empleando el software de ImageJ.

7.4 Ensayos de Inmunoprecipitación

Los experimentos de inmunoprecipitación (IP) se realizaron a partir de fracciones solubles en NP40 obtenidas como se ha indicado anteriormente. En todos los casos se utilizaron extractos con una concentración de proteínas igual a 3 mg/ml. Se utilizaron bolas de proteína A-Sefarosa (Sigma; Ref. P9424) en aquellos casos en los que se usaron anticuerpos policlonales de conejo, y bolas de Proteína G-Agarosa (Sigma; Ref. P3296) en los casos que se usaron anticuerpos monoclonales de ratón.

A unos 50 µl totales de bolas (preparadas al 50% v/v en tampón Tris-HCl NP40 al 1%) se añadieron 100 µl de tampón Tris-HCl NP40 al 1% y entre 0,5 y 2 µg del anticuerpo en función de la especificidad de éste. Las bolas con los anticuerpos se incubaron a 4°C en agitación constante durante aproximadamente 2 horas. A continuación, se centrifugaron a 3000 g durante 3 minutos a 4°C, y se lavaron 3 veces con el mismo tampón.

A continuación, se añadió el extracto celular, normalmente entre 900 y 1200 µg totales, y se incubó en agitación a 4°C durante 2 horas o toda la noche. En todos los casos se hizo un “*preclearing*” pasando los extractos celulares primero por la matriz de bolas sin anticuerpo para eliminar del extracto aquellas proteínas que presentasen afinidad por la matriz empleada en cada caso. Este “*preclearing*” se hizo también durante 2 horas a 4°C en agitación constante.

Por último, la matriz de bolas incubada con los extractos se centrifugó; el sobrenadante se recuperó para su posterior análisis y las bolas se lavaron 3 veces en tampón Tris-HCl NP40 a 1% y dos veces en agua bi-destilada.

Las muestras se hirvieron durante 5 minutos en tampón *Sample Buffer* (Tris-HCl 0,0625 M, glicerol al 10%, SDS al 2% y β-mercaptoetanol al 5%) pH 6,8 para su posterior análisis mediante WB.

8. Generación de dos anticuerpos policlonales frente a CDK5Rap2

Tal como se explica detalladamente en el apartado 1.2.2 del capítulo de Resultados del presente trabajo, las limitaciones de los anticuerpos comerciales existentes para CDK5RAP2 a la hora de garantizar la ausencia de subproductos proteicos en los mutantes y de poder caracterizar adecuadamente las células *knockout*, nos llevaron a la necesidad de desarrollar anticuerpos frente a otras regiones de la proteína. De este modo, decidimos generar dos anticuerpos policlonales distintos, uno capaz de reconocer la región que comprende desde el aminoácido 650 al 900 y otro frente al fragmento de la proteína que comienza en el aminoácido en posición 1.400 y termina en el aminoácido en posición 1.600 de la proteína humana, en colaboración con la empresa Biomedal, S.L.

Para ello, estos fragmentos fueron clonados en el plásmido de expresión pMAB36-6xHis-LYTAG. El método empleado para la purificación (número de publicación internacional de patente WO 2014/029894 A1; Solicitante: Biomedal, S.L.), es un método de separación de polipéptidos o proteínas fusionados a secuencias de polihistidina (“His-Tag”), en sistemas acuosos de dos fases en el que uno de los componentes es PEG, y en el cual la proteína etiquetada con polihistidina se reparte preferentemente

en la fase rica en PEG en condiciones determinadas. El proceso de purificación se completa con una inversión en el reparto del fragmento etiquetado por la adición de colina (gracias a la otra etiqueta -LYTAG- que consiste en un dominio de unión a colina), lo que da como resultado la recuperación de dicho péptido en la fase opuesta.

Para clonar el fragmento que comprende desde el aminoácido 650 hasta el 900, se diseñaron los siguientes oligos:

- Oligo forward con la diana EcoRV:
5'- GATCGATATCCAAGAAGAACTTAAGAAAAAG- 3'
- Oligo reverse con la diana KpnI:
5'-GATCGGTACCGTGTTGATCGGTTTCTC - 3'

Para clonar el fragmento que comprende desde el aminoácido 1400 hasta el 1600, se diseñaron los siguientes oligos:

- Oligo forward con la diana EcoRV:
5'- GATCGATATCGAAATTCGAACTTTGAGA- 3'
- Oligo reverse con la diana KpnI:
5'-GATCGGTACCAGAGCCTGGATCTCCAT- 3'

En ambos casos, se utilizó como molde para la PCR el ADN del plásmido pRcCMV-Cep215 (Addgene; Ref.41152). La construcción final fue enviada a la empresa Biomedal S.L. (Sevilla, España) quien se encargó del proceso de purificación de los fragmentos usados como antígenos, así como de la inmunización de los conejos y de la purificación por afinidad de los anticuerpos resultantes (SC3-1 y SC3-2).

9. Técnicas de Inmunocitoquímica

9.1 Inmunofluorescencia indirecta (IF) de monocapas de células adheridas a cubreobjetos

Se utilizaron monocapas de células adheridas a cubreobjetos. Las células se fijaron o bien en metanol durante 6 minutos a -20°C, o bien en paraformaldehído (al 3% en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente. En este último caso, las células se permeabilizaron con PBS-Tween 0,1%-Tritón 0,5% durante 5 minutos a temperatura ambiente, después de fijar.

Las diluciones de los anticuerpos se realizaron en tampón PBS1x-Tween 0,1%-BSA 3%, y los lavados se realizaron con tampón PBS1x-Tween 0,1%. Tras la fijación, las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante al menos una hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 2 veces y se añadieron los anticuerpos secundarios, incubándose, como mínimo, 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente 2 veces (cinco minutos por lavado), y se deshidrataron durante 2 minutos en etanol 100%. Como medio de montaje, se usó N-propilgalato al 2% diluido en PBS1x 10%

y glicerol 90%.

9.2 Cultivo de células sobre cubreobjetos CYTOOchips.

Para los experimentos de cultivo celular sobre cubreobjetos con un patrón específico (*micropattern*), las células fueron sembradas en CYTOOchips de la empresa CYTOO SA (Grenoble, Francia). Más concretamente, se usó el CYTOOchip Starter que ha sido diseñado para permitir la identificación de qué patrón funciona mejor en una aplicación específica, dado que incluye 4 tipos de patrones (disco, ballesta, H y Y) y 3 tamaños diferentes (S: 700 mm², M: 1100 mm² y L: 1600 mm²).

Para el cultivo de las células, se siguió las indicaciones del fabricante. Así, el cultivo fue diluido a una concentración inicial de 12.500 células/ml. A continuación, 50.000 células se añadieron a cada uno de los cubreobjetos y se dejaron depositar durante 10 minutos antes de trasladarlos al incubador. Transcurridos unos 45 minutos, se cambió el medio para retirar los restos celulares y se dejó que las células adheridas se extendieran de forma adecuada durante 5 horas antes de proceder a la fijación y análisis de las mismas. El análisis que se muestra se realizó en la zona de los micropatterns en forma de ballesta, de tamaño S y M.

10. Transfección transitoria de moléculas de ADN

10.1 Electroporación

En la mayoría de los casos, la transfección de ADN se hizo mediante electroporación, empleando el sistema *Neon Transfection System* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, un día antes de la electroporación las células se cultivaron en medio de cultivo completo a la densidad adecuada para que estuviesen aproximadamente al 70-80% de confluencia en el momento de la electroporación. En primer lugar, se introdujeron en el electroporador los parámetros de electroporación correspondientes al tipo celular empleado y se añadieron 3 ml de tampón electrolítico (*Electrolitic buffer*; Ref. 1E11020) en la cubeta de electroporación (denominada *Neon tube*). Asimismo, se prepararon las placas de cultivo sobre las que posteriormente iban a sembrarse las células recién electroporadas y sobre estas placas se añadió el medio completo correspondiente al tipo celular empleado. En segundo lugar, las células se tripsinizaron, se contaron y se centrifugaron a 500x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por cada evento de electroporación se necesitaron entorno a 1×10^6 - 10×10^6 de células, las cuales se recogieron y se colocaron en un tubo. A continuación, se centrifugaron en las mismas condiciones antes detalladas y se realizó un lavado con PBS1x para retirar el medio de cultivo. El *pellet* de células se resuspendió en un volumen adecuado de tampón de resuspensión (*Resuspension buffer*; Ref. MPK1096).

En tercer lugar, las células resuspendidas se añadieron a un tubo eppendorf previamente preparado con la cantidad de ADN necesaria a ser electroporada (1 µg por cada 1×10^6 de células). Esta mezcla de ADN y células fue recogida con la pipeta (*pipeta Neon*), con suavidad e intentando no

originar burbujas, y se introdujo en el electroporador para llevar a cabo la correspondiente descarga eléctrica. Finalmente, las células se añadieron a un tubo previamente preparado con 500 µl de medio completo. Se resuspendieron en este medio, se recogieron y se añadieron a la placa con medio, que había sido preparada con anterioridad.

10.2 Lipofección.

En caso de que por las características del experimento no fuera posible la electroporación, las células se transfectaron usando lipofectamina *Lipo293™* (SigmaGen® Laboratories; Ref. SL100668). Un día antes de la transfección las células se cultivaron sobre cubreobjetos en medio de cultivo completo a la densidad adecuada para que estuviesen, aproximadamente, al 70-80% de confluencia en el momento de la transfección. 1-2 horas antes de la transfección, el medio de cultivo de las células se sustituyó por medio de cultivo fresco suplementado con suero y antibióticos (1000 µl para un pocillo de una placa de cultivo de 9,6 cm²) y se preparó la mezcla de transfección. A continuación, se indican las cantidades utilizadas para transfectar células cultivadas en placas multipocillo de 9,6 cm² de área por pocillo (NUNC; Ref. 140675):

Solución A	50 µl medio sin suero + 3 µl de Lipofectamina
Solución B	50 µl medio sin suero + 1 µg del ADN a transfectar

Cada solución se mezcló por separado agitando 3 o 4 veces. A continuación, se mezclaron ambas soluciones y se incubaron durante 10 minutos. Inmediatamente después, la mezcla de transfección se añadió gota a gota sobre las células manteniendo la placa en movimiento suave constante. Aproximadamente 12-16 horas después, el medio de transfección se sustituyó por medio de cultivo completo y 24 horas después las células se procesaron para su análisis mediante IF o WB.

11. Inhibición de la expresión de proteínas

Para inhibir la expresión proteínas, se utilizaron dos estrategias alternativas: siRNAs (inhibición transitoria) y el sistema CRISPR/Cas9 (inhibición permanente).

11.1 Inhibición a nivel de ARNm: ARN de interferencia (siRNA)

Las secuencias de los siRNAs usados fueron las siguientes:

Proteína	Nombre	Secuencia	Procedencia
PCNT	PCNTB-1	5'- AAAAGCTCTGATTATCAAAAGAAG -3'	Sigma
	PCNTB-2	5'- TGATTGGACGTCATCCAATGAGAAA -3'	Sigma
CDK5Rap2	CDK5Rap2	5'- CCTAAAGCTCCGCATCTATTT -3'	Sigma

CEP192	CEP192-1	5'- CACATGATGCCTGCTAGTT -3'	Sigma
	CEP192-2	5'- GACACTTTCTTCATGAGCA -3'	Sigma
	CEP192-3	5'- GGACTTAAGTGCTACTAGT -3'	Sigma

En el caso de CDK5RAP2 sólo un dúplex se empleó para la correcta y eficiente inhibición de la expresión de la proteína; mientras que para el caso de PCNT y CEP192 se combinaron hasta 2 y 3 dúplexes respectivamente. Como control se utilizó un dúplex con una secuencia aleatoria o scramble. Todos los siRNAs fueron obtenidos de Life Technologies y Sigma-Aldrich, y se usaron a una concentración final de 100 nM.

La transfección con los siRNAs se llevó a cabo mediante electroporación; empleando el sistema *Neon Transfection System* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante y el procedimiento anteriormente detallado para el ADN. En todos los casos la máxima eficiencia de inhibición se obtuvo entre las 72 y 96 horas después de la transfección.

11.2 Inhibición a nivel de ADN: Generación de células hTERT-RPE1 mutantes para akap450, cdk5rap2 y/o pcnt y cep192 mediante la técnica CRISPR/Cas9

Para llevar a cabo la edición del genoma de una línea celular humana, y por las razones que se detallan en el capítulo de Resultados, se generó un vector propio con dos sitios de clonación independientes para dos ARN guía de cadena simple (single-guide RNAs; sgRNAs), además de las secuencias de la Cas9n y de un gen reportero (en este caso la eGFP). Para ello, se usó como base el vector pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461) de Addgene (Ref. 48140), el cual contiene el gen correspondiente a la proteína *Cas9-nickase*, además de un promotor hU6, un par de sitios BbsI para la clonación del ARN guía (sgRNA, de las siglas en inglés *single guide RNA*) y una secuencia que codificaba un *scaffold* (andamio) de ARN, necesario este último para el correcto funcionamiento de la Cas9n. En el sitio XbaI del PX461 se introdujo un fragmento de ADN de 409 nucleótidos que incluía otra copia del promotor hU6, un par de sitios BsaI para la clonación del ARN y la secuencia del *scaffold* de ARN. Este fragmento se obtuvo mediante la realización de una PCR en la que se usó como molde el plásmido pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromicina (Addgene; Ref. 51133) y como oligos, el oligo pFA2 (5'- TCTAGAGAGCGGCCGCCCCCTTACC -3') y el oligo pFA3 (5'- TCTAGAGTCTCGAGGTCGAGGATTC -3'). El plásmido pFA1 resultante, nos permitió expresar en un único plásmido tanto la Cas9n como dos sgRNAs, incrementando así la eficiencia y especificidad de la mutagénesis mediada por Cas9n (ver Figura R1).

Los oligos (sgRNAs) fueron dirigidos específicamente frente a los primeros exones de los genes de interés, concretamente los exones 2, 1, 5 y 3 para akap450, cdk5rap2, pcnt y cep192 respectivamente. El diseño y clonación de los mismos en el plásmido pFA1 fueron realizados siguiendo las herramientas y los protocolos disponibles en la página web de Feng Zhang (<http://crispr.mit.edu/>). Para cada secuencia diana de los sgRNA se diseñaron dos parejas de oligos complementarios. Para facilitar la clonación de los mismos en el plásmido pFA1, estos oligos fueron diseñados con extremos cohesivos, los cuales

fueran homólogos a los que se generaban en las hebras de ADN del plásmido pIFA1 después de su digestión con las enzimas específicas de los sitios de clonación de los sgRNAs (BbsI o BsaI). Las parejas de oligos utilizadas para generar las secuencias codificantes de los sgRNA fueron:

Gen (exón)	Sitio de clonación en pIFA1	Secuencias
akap450 (exón 2)	BbsI	CACCGAGAAATAACCAGTCATGAGC/ AAACGCTCATGACTGGTTATTTCTC
	BsaI	CCGGGTTCTCATTATTGTAGATTG/ AAACGAATCTACAATAATGAGAAC
cdk5rap2 (exón 1)	BbsI	CACCGAAGAGGACGTCACCGTCCCT/ AAACAGGGACGGTGACGTCTCTTC
	BsaI	CCGGCAAGTCCATCATGGCTACAG/ AAACCTGTAGCCATGATGGACTTG
pcnt (exón 5)	BbsI	CACCGCAACATGCACACGGCGCAGC/ AAACGCTGCGCCGTGTGCATGTTGC
	BsaI	CCGGGGCGCAGCGCCTCCAGCTCA/ AAACTGAGCTGGAGGCGCTGCGCC
Cep192 (exón 3)	BbsI	CACCGAGGGCCAAGATCTTTCAAC/ AAACGTTGAAGAGATCTTGCCCTC
	BsaI	CCGGGAAGGATTCTGTAGCTCCGGC/ AAACGCCGGAGCTACAGAATCCTTC

Para obtener la cadena de ADN de doble cadena, cada pareja de oligos se sometió a un protocolo estándar de hibridación y a continuación fueron clonados en el plásmido pIFA1 en sus dianas correspondientes.

El plásmido resultante para cada caso, fue electroporado en células RPE-1 FRT/TO mediante el sistema de transfección *Neon transfection System* (protocolo detallado previamente). La eficiencia de transfección de los plásmidos en cada caso pudo ser valorada gracias a la expresión de la proteína fluorescente GFP (fusionada a la proteína Cas9n). Tres días después de haber llevado a cabo la electroporación, estas células fueron seleccionadas mediante el empleo del *cell sorter* (*Sorter BD FACS Aria™ Cell Sorter*; BD Biosciences) eligiendo el 90% de las células que más fluorescencia de GFP presentaban.

Se recogió así un *pool* de células con señal GFP positiva y éste fue amplificado en cultivo. Para evaluar la eficiencia del proceso de mutagénesis, estas poblaciones celulares fueron analizadas mediante ensayos de IF usando un anticuerpo frente a la proteína de interés. Se cuantificó el porcentaje de células que carecían de señal para la proteína en cuestión y se estableció este criterio como eficiencia de mutación. Las poblaciones con una alta frecuencia de células mutantes (en las que más del 10% de las células eran negativas para el marcaje del anticuerpo) fueron usadas para el posterior aislamiento de células en placas de 96 pocillos con el fin de generar clones y poder aislar células mutantes para la

proteína de interés. Después de este procedimiento, se obtuvieron clones de células puros.

En el caso concreto de Cep192, a pesar de observar células carentes de la proteína en el pool inicial, no fue posible aislar clones puros, de ahí que se decidiera llevar a cabo el silenciamiento mediante ARN de interferencia.

Cada uno de los clones mutantes para las otras tres proteínas se analizó mediante ensayos de IF usando anticuerpos frente AKAP450 (A24), CDK5Rap2 (Millipore) y PCNT (Abc-R) respectivamente. Aquellos clones sospechosos de ser knock-out por la pérdida de marcaje en la IF, fueron seleccionados para su posterior amplificación y análisis detallado. Para ello, se amplificó mediante PCR a partir de ADN genómico una región de aproximadamente 500pb que incluía la zona de mutación empleando los siguientes oligos: akap450-FW 5'-AAGCAGTGAATGACAGTGCC -3', akap450-RV 5'-ATCCCTGTCAAAATCCGTGG -3'; cdk5rap2-FW 5'-CTAGAAAAGCAAACACGAGG -3', cdk5rap2-RV 5'-TTGTCCA ACTCTAGCCAAGG -3'; y pcnt-FW 5'-GCTCTGTTATCCCCACAGGGCACAG -3' pcnt-RV 5'-ACACCGTGACTTCCAGACACACAGG -3'.

Los productos de PCR se clonaron en el vector *pGEM®-T Vector System I* (Promega, Ref. A3600) y se secuenciaron aprovechando los oligos SP6 y T7 presentes en el mismo, mandando a secuenciar tantos clones como fuera necesario hasta dar con los dos alelos de cada gen.

En el caso de los dobles mutantes PCNT-AKAP450 y PCNT-CDK5Rap2, las líneas celulares mutantes se generaron a partir de la línea pcnt KO y empleando los plásmidos descritos anteriormente (pIFA1 con los guías para AKAP450 y CDK5Rap2 respectivamente).

12. FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)

Para evaluar la influencia del centrosoma en la integridad del AG realizamos experimentos de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) sobre una línea estable que expresa los primeros 81 aa de la proteína humana β 1,4-galactosiltransferasa (GT) fusionados a la proteína fluorescente GFP. Después de 5 días de tratamiento con DMSO/centrinona, las células se transfectaron con la Tomato-centrina2, como marcador de los centriolos, y unas 75.000 células se sembraron en placas de video de 8,8 cm². 24 horas después de la transfección se procedió a la realización del experimento de FRAP, mediante el uso de un microscopio confocal (TCS SP5) equipado con un sistema de control de la temperatura (la cual fue ajustada a 37°C) y del CO₂ (el cual fue ajustado al 5%). El objetivo utilizado para visualizar las células y llevar a cabo el ensayo fue el objetivo de inmersión de 63X (HCX PL APO Lambda blue 63x 1.4). Dos horas antes de comenzar el experimento de FRAP, se retiró el medio de las células y se añadió medio de cultivo completo sin rojo fenol (DMEM, Sigma; Ref. D6434). Gracias al marcaje de la tomato-centrina2, se seleccionaron las células sin centriolos en el grupo de las células tratadas con centrinona y se tomó una imagen (verde/rojo) para mostrar. Se adquirieron tres imágenes antes del quemado o photobleaching (este periodo de tiempo de adquisición de imágenes antes del photobleaching fue denominado prebleaching). Seguidamente se realizó el photobleaching de la señal emitida por la proteína GT-GFP usando un pulso del láser 488-nm a la máxima intensidad durante un

segundo. El área elegida para hacer el photobleaching, denominada ROI (region of interest), fue de XXXXX. Seguidamente, se tomaron imágenes cada segundo durante 150 segundos.

La cuantificación de la dinámica de la proteína GT-GFP después del photobleaching fue llevada a cabo mediante la aplicación Region Measurements del software MetaMorph v. 7.5.1.0. En primer lugar, las imágenes adquiridas durante el experimento fueron convertidas en imágenes de 16 bits (dentro de la ventana process, se seleccionó el comando arithmetic para poder realizar esta conversión). En segundo lugar, se estableció un tamaño de región fijo, similar al tamaño del ROI utilizado durante la realización del experimento. Se colocó una región en la zona donde se realizó el photobleaching y otra región en el citoplasma de la célula a cuantificar (para obtener el valor del background). A continuación, con la aplicación Region Measurements se obtuvo información de la intensidad de fluorescencia integrada de la proteína GT-GFP en ambas regiones. Esto se hizo para las 3 imágenes del prebleaching, obteniéndose la media y para cada una de las imágenes posteriores. El programa generó un documento Excel con todas las medidas obtenidas y seguidamente se procedió a la corrección del background.

Para la cuantificación de la recuperación de la fluorescencia, usamos la siguiente fórmula:

$$\frac{(I_x - I_0)}{(I_{pre} - I_0)} * 100$$

donde:

(I_{pre}) : Media de la intensidad en el prebleaching. Se realizó la media de los tres valores de Intensidad Integrada correspondientes al prebleaching.

$(I_{pre} - I_0)$: Rango inicial de intensidad. Se restó el valor de la intensidad integrada tras el bleaching (I_0) a la media de intensidad en el prebleaching (I_{pre}).

(I_x) : Valor único de intensidad integrada en cada frame.

Este procedimiento fue realizado en todas las células control y en todas las células sin centrosoma que habían sido filmadas. A continuación, se calculó el valor medio de intensidad en cada frame correspondiente al cultivo control y el correspondiente a las células sin centrosoma. Por último, se representó en una gráfica la recuperación media de intensidad (fluorescence recovery) de todas las células control frente a la obtenida en células carentes de centrosoma. El valor de intensidad medio obtenido para cada frame fue representado en el eje Y frente al tiempo en el eje X.

13. Ensayo de nucleación de microtúbulos: Ensayos de repolimerización.

Los ensayos de nucleación de microtúbulos (MTs) se llevaron a cabo en células cultivadas sobre cubreobjetos, siendo clave en este tipo de experimentos que el cultivo esté en buen estado, que las células estén bien adheridas a los cubreobjetos y que la confluencia sea adecuada a fin de disminuir la variabilidad del experimento.

Los MTs se despolimerizaron incubando las células con nocodazole (NZ) a 10 μ M durante 3 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de despolimerización, los cubreobjetos se lavaron 5 veces en medio de cultivo completo frío, incubado en hielo o a 4°C. Para ello, los cubreobjetos se colocaron en un *mini-rack* (*Coverslip Mini-Rack*. Molecular Probes; Ref. C-14784), y con ayuda de una pinza, el *mini-rack* se sumergió 5 veces rápidamente en el medio frío. Después, los cubreobjetos o bien se fijaron en metanol a -20°C, o se incubaron en placas de cultivo, en las que se había añadido medio de cultivo precalentado a 37°C para llevar a cabo los ensayos de repolimerización. Posteriormente, a distintos tiempos de repolimerización, los cubreobjetos se colocaron de nuevo en el *mini-rack* y se sumergieron en un recipiente con metanol a -20°C durante 6 minutos. Después de la fijación, las células se procesaron por ensayo de IF como se ha descrito anteriormente. Siempre se fijaron cubreobjetos antes de añadir NZ y a tiempo cero como control de la correcta despolimerización.

Para los ensayos de nucleación en células sin centrosoma, las células fueron tratadas previamente con centrinona 125nM durante 5-7 días. Para los experimentos de sobreexpresión de PLK4, las células fueron tratadas con centrinona (125nM) durante al menos 5 días, tras lo que se lavó la droga y las células se reincubaron en medio completo durante otras 48h.

En el caso de los experimentos llevados a cabo con gatastatina, 10 minutos antes de que acabara el tratamiento de 3 horas con NZ se añadió la gatastatina (30 μ M) en hielo y después de lavar se añadió el medio precalentado a 37°C en presencia de la misma. Tanto en un caso como en otro se añadió DMSO a las condiciones controles.

14. Análisis del ciclo y volumen celular por citometría de flujo

La cuantificación del contenido de ADN permite determinar la distribución de una población celular a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. Uno de los colorantes más utilizados para la medida del ciclo celular en citometría de flujo es el Yoduro de propidio (PI), un intercalante de ADN y de ARN de doble cadena. El protocolo de preparación de las muestras para citometría se describe a continuación: en primer lugar, las células se tripsinizaron, se recogieron y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Luego se hizo un lavado en PBS1x (4 ml a 4°C) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Después se eliminó el PBS1x y el *pellet* de células fue resuspendido en 1 ml de etanol frío al 70% gota a gota y en agitación constante. Las células se dejaron a 4°C al menos 18 horas hasta su marcaje con PI. Para la tinción con PI, las células se centrifugaron 10 minutos a 3.000 rpm, se retiró el etanol y tras un lavado con 2 ml de PBS1x a 4°C, el *pellet* de células fue resuspendido en 250 μ l de PBS1x, sobre los que se añadieron 250 μ l de solución de extracción de ADN (190 ml Na_2HPO_4 0,2 M +

8 ml de Ácido cítrico 0,1 M a pH 7,8). Las células fueron incubadas con esta solución 10 minutos a 37°C. Tras ello, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 250 µl de solución PI/ARNasa (PBS1x + 100 µg/ml ARNasa + 40 µg/ml PI). A continuación, las células se incubaron 30 minutos a 37°C en oscuridad y finalmente fueron analizadas mediante citometría de flujo. El histograma típico del análisis del contenido de ADN en células de mamífero tiene dos picos correspondientes a las fases G0/G1 y G2/M, además de un “valle” que se corresponde con la fase S del ciclo.

Para nuestro análisis, comparamos células control y células tratadas con centrinona (125 nM) durante 5-7 días (que en su mayoría se trata de células sin centriolos). Más concretamente, nos centramos en los valores del volumen de las células que vienen definidos por los valores obtenidos por el detector dispersión frontal (FSC en inglés) fijándonos en 3 condiciones: 1) células incluidas en el pico G1/G0, 2) células incluidas en el pico G2/M y 3) población total de las células.

15. Microscopía

15.1 Microscopía de Epifluorescencia

Las preparaciones se observaron rutinariamente en un microscopio vertical AxioImager.2 de Zeiss con una lámpara HXP120W, acoplado a una cámara AxioCam 503 monocromática de amplio rango dinámico (14bits: 16384 niveles de grises) y gran campo de visión (1936x1460px). Las adquisiciones se hicieron usando el objetivo de inmersión 63x (Plan- Apochromat 63x /1.40 oil). Para los distintos fluorocromos utilizados se usaron los siguientes filtros:

49DAPI	DAPI
52He488	Alexa Fluor 488/GFP
43DsRed	TRITC/Cy3
50Cy5	Alexa Fluor 633

Una de las principales características de este equipo es que permite incorporar un dispositivo de iluminación estructurada, ApoTome.2, en la ruta de iluminación. Este dispositivo proyecta la luz de manera estructurada en diferentes planos focales, creando diversas imágenes. Éstas, son procesadas a tiempo real a través de un algoritmo, que elimina la fluorescencia fuera de foco antes de reconstruirlas en una sección óptica final, mejorando tanto la sensibilidad como su presentación en una imagen integrada.

15.2 Microscopía confocal

Las imágenes de microscopía confocal fueron adquiridas en un microscopio confocal Leica TCS SP5 que dispone de las siguientes líneas de excitación: 405, 458, 476, 488, 496, 514, 561, 594, 633 nm, y usando un objetivo de inmersión de 63X (HCX PL APO Lambda blue 63x 1.4) a 22°C. Se obtuvieron una serie de cortes seriados además de la proyección máxima. Para las cuantificaciones, se usaron siempre

las imágenes en bruto. Para las figuras, las imágenes adquiridas se procesaron con los programas de LAS AF (Leica) y Adobe Photoshop, para ajustar el tamaño, contraste o brillo, siempre a la imagen completa.

16. Análisis de imágenes

16.1 Análisis de la intensidad de fluorescencia de distintas proteínas en el centrosoma

Para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las distintas proteínas en el centrosoma (AKAP450, CDK5Rap2, PCNT y γ -tubulina) se empleó el software MetaMorph v. 7.7.1.0.

En primer lugar, se adquirieron imágenes con el microscopio de fluorescencia Zeiss Apotome anteriormente descrito. Se usaron en todos los casos dobles o triples marcajes que tuvieran en uno de los canales el marcaje de la proteína centrosómica CAP350 para indicar la posición del mismo. Se dibujaron regiones de interés (ROI de sus siglas en inglés Region Of Interest) de 1,5 μm de radio alrededor de 70-100 centrosomas elegidos al azar y posteriormente, estas regiones fueron copiadas en los canales que contienen la fluorescencia de las demás proteínas a analizar. Se estableció un “threshold” o umbral de intensidad a partir del cual se considera marcaje específico y con la aplicación *Region Measurements* del software, se obtuvo información de la intensidad de fluorescencia integrada de cada una de las proteínas en el centrosoma. La media de los valores de intensidad de las células WT fue considerado el 100% y en función de éste se calcularon los valores en porcentaje (%) del resto de las condiciones analizadas.

16.2 Análisis de la nucleación de MTs desde el centrosoma

Como se explica en el apartado de Resultados, el análisis de la nucleación de MTs desde el CTR se hizo combinando dos métodos independientes pero complementarios:

A) Análisis de la densidad del “áster” de MTs del centrosoma en ensayos de repolimerización tras un tratamiento con nocodazole (NZ).

Consiste en cuantificar la intensidad de la fluorescencia del marcaje de EB1 alrededor del centrosoma en experimentos de repolimerización de microtúbulos, 3 minutos tras el lavado del NZ. El procedimiento llevado a cabo fue similar al anteriormente descrito, salvo que en esta ocasión se estableció un ROI de 3 μm de radio. Nuevamente, se usó el marcaje de CAP350 para indicar la posición del centrosoma y se obtuvieron los datos de intensidad de fluorescencia integrada de 70-200 centrosomas elegidos al azar. La media de los valores de intensidad de las células WT fue considerado el 100% y en función de éste se calcularon los valores en % del resto de las condiciones analizadas. Para evitar alteraciones en la intensidad de los ásteres debidas a la variabilidad en el tiempo o temperatura a la que se realizaban los experimentos, todas las cuantificaciones de repolimerización de microtúbulos se llevaron a cabo en experimentos con mezclas de células WT y los correspondientes KO; o células transfectadas con siRNA control o

siRNA-CEP192 respectivamente.

B) Determinación del número de cometas de EB1 alrededor del centrosoma.

Como aproximación alternativa a la medida de la nucleación de MTs desde el centrosoma, decidimos cuantificar el número de cometas de EB1 alrededor del centrosoma (ver Figura R11). Se empleó un procedimiento previamente descrito (Burute et al. 2017) empleando para ello el software de *ImageJ*. Concretamente, se adquirieron imágenes con el microscopio de fluorescencia *Zeiss Apotome* y las imágenes fueron procesadas para substraer la señal de fondo empleando un *Rolling-ball radius* de 50. A continuación, se dibujaron regiones de interés de 3µm de radio y se determinó el número de cometas de EB1 saliendo del centrosoma con la función *Find Maxima*. Nuevamente, los valores obtenidos en cada condición se normalizaron con aquellos registrados para las células controles.

16.3 Análisis de la nucleación de MTs desde el AG

La cuantificación de la nucleación de MTs desde el AG en condiciones de control y células tratadas con centrinona (Figura R23) fue llevada a cabo mediante la aplicación de un software especialmente diseñado para tal efecto por la empresa Wimasis (Wimasis GmbH, Munich, Alemania). Se obtuvieron imágenes de confocal con un doble marcaje anti-EB1 (488) y anti-giantina (Cy3). Las imágenes de los dos colores combinados en bruto se subieron a la plataforma con el software que devolvía como OUTPUT una lista numerada de cada uno de los fragmentos de Golgi presentes en una imagen y el número de MTs asociados a cada uno de ellos. En un paso posterior, cada una de las imágenes fue procesada de manera manual de modo que se identificaron y delimitaron las células individualmente y se excluyeron de los datos los centrosomas de las células controles. Esto nos permitió obtener 3 parámetros para cada célula: el número de elementos de Golgi capaces de nuclear MTs, el número específico de MTs que estaban siendo nucleados desde cada elemento de Golgi y el número total de microtúbulos creciendo desde el AG en cada célula completa (ver Figura R23 para más detalle).

En el caso de los experimentos de lavado de centrinona para inducir la sobreexpresión de PLK4 y por tanto la aparición de centrosomas extras (Figura R26), el análisis de la nucleación de MTs desde el AG se llevó a cabo de manera cualitativa en vez de cuantitativa. Así, se seleccionaron células con 6 o \geq 8 centriolos visibles (identificados gracias al marcaje con CEP63) y se subdividieron en dos categorías: células con o sin actividad de nucleación de MTs desde el AG. Las células controles y aquellas sin centrosomas también se analizaron para obtener los valores de referencia de los controles.

16.4 Análisis de colocalización de proteínas

16.4.1 Experimentos sin centrinona

El análisis de la colocalización entre las diferentes proteínas de interés y el AG se llevó a cabo también mediante el software MetaMorph v. 7.5.1.0, pero en este caso usando el módulo "Colocalización". En primer lugar, se tomaron imágenes en el microscopio evitando la saturación de los

pixeles más brillantes. Todas las condiciones a comparar estaban incluidas en el mismo experimento. A continuación, empleando el software mencionado, se estableció un umbral de señal de manera individual para cada uno de los canales (proteína de interés y Golgi respectivamente) y se aplicó a todas las imágenes. Además, se seleccionaron ROIs específicos para cada caso de forma que se delimitara el contorno de la célula y se excluyera el marcaje del centrosoma; ya que muchas de las proteínas analizadas también se hallan en esta estructura. Finalmente, empleando la aplicación *Colocalización*, el programa determinó la intensidad de colocalización existente entre ambos marcajes en cada célula individual. Todos los experimentos de colocalización se llevaron a cabo en presencia de NZ (10 μ M durante 3h) a fin de fragmentar el AG y facilitar la cuantificación.

Para el análisis específico de la intensidad de EB1 en las membranas del AG cuyos datos se muestran en las figuras R15 y R30, no se cuantificó la nucleación de MTs usando el software de Wimasis debido a la complejidad del procedimiento. Alternativamente, se utilizó un método recientemente descrito en la literatura (Wu et al. 2016), que consistía en medir la colocalización de la señal de EB1 sobre las membranas de Golgi, en un ensayo de repolimerización de MTs de 3 minutos tras el tratamiento con NZ.

16.4.2 Experimentos con centrinona

En el caso de la cuantificación de la asociación de las diferentes proteínas del PCM con el AG en condiciones de tratamiento con centrinona, no se pudo llevar a cabo el procedimiento anterior ya que no tenía en cuenta los agregados de las proteínas que estaban asociados al Golgi, pero que cuya fluorescencia no solapaba con éste tal y como ocurría en los casos anteriores, sino que se distribuían a modo agregados íntimamente relacionados, pero no coincidentes, con las membranas de Golgi.

En este caso, el primer paso de la cuantificación se llevó a cabo de manera manual, seleccionando uno a uno los fragmentos de Golgi (mediante la herramienta ROI de MetaMorph) que presentaban de manera evidente algún marcaje de proteínas del PCM asociados a ellos. Después, se midió la intensidad de fluorescencia integrada de cada uno de estos elementos, sumando todos los valores que estuvieran dentro de una misma célula. Los elementos individuales de al menos 14 células fueron delineados, con un total de al menos 500 elementos para cada experimento.

16.5 Análisis de la intensidad total de MTs

Para analizar la cantidad total de MTs presentes en la célula en las diferentes condiciones, de nuevo se utilizó el software MetaMorph v.7.5.1.0. Las imágenes obtenidas se procesaron de igual modo que en los casos anteriores y se establecieron regiones de interés (ROIs) en torno a las células de modo que se obtuvieran valores individualizados. Además, se determinó un umbral adecuado que eliminase la señal de fondo. La intensidad de fluorescencia integrada para el marcaje de α -tubulina y el área de cada una de las células se calcularon con la herramienta *Region measurements* del software. Los datos obtenidos se emplearon para calcular la densidad de MTs por célula siguiendo la fórmula:

intensidad de fluorescencia integrada

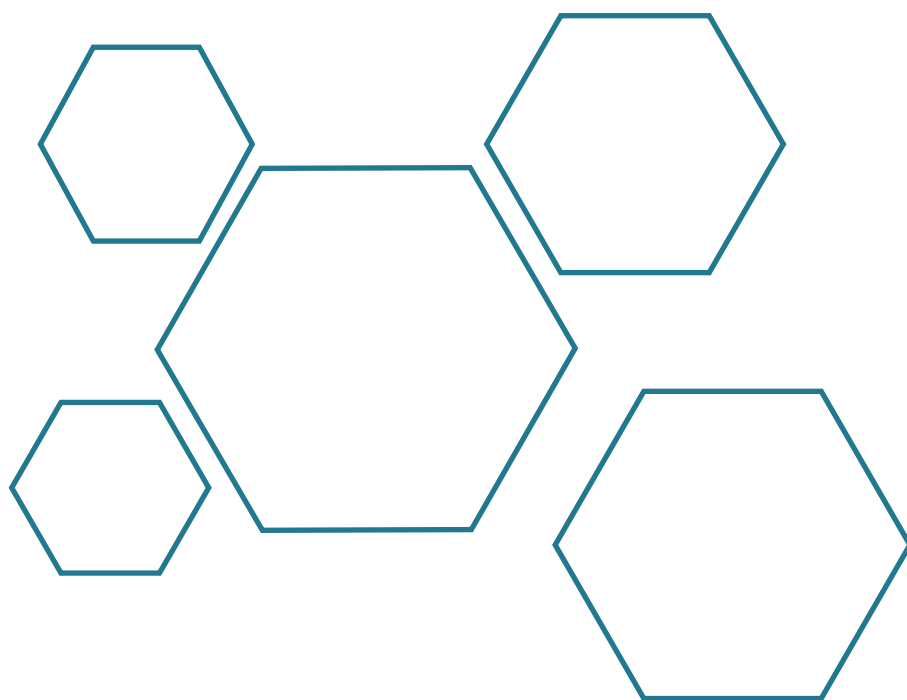
área de la célula

En el caso del marcaje de EB1, la cuantificación del número de cometas por célula se llevó a cabo empleando la función *Find Maxima* del software ImageJ tal y como se describió para la cuantificación de los cometas saliendo desde el centrosoma, salvo que en esta ocasión el ROI establecido correspondía al perímetro de cada célula. Nuevamente, las imágenes tomadas en el microscopio fueron procesadas para substraer la señal de fondo empleando un *Rolling-ball radio* de 50. Y los valores obtenidos en cada condición se representan en relación a los obtenidos en las células controles.

16.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico y las gráficas se hicieron con el programa *GraphPad Prism 7*. En primer lugar, se comprobó que los datos se ajustaban a un modelo de distribución normal o Gaussiana (distribución que asumen los tests estadísticos más frecuentemente utilizados o tests paramétricos). Todos los datos cuantitativos están expresados como la media \pm DE, normalizando los valores a las condiciones control. Salvo que se indique lo contrario, se muestran sólo valores entre los percentiles 10 y 90. La comparación de los datos entre dos grupos se realizó mediante el test *t de Student*. La comparación entre varios grupos se realizó mediante ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Turkey o Dunnett según correspondiera. Las diferencias se consideran significativas para un valor de $p < 0.05$ (intervalo de confianza del 95%). En las gráficas mostradas en el presente trabajo, las diferencias estadísticamente significativas se expresan mediante los símbolos: * cuando $p < 0.05$; ** cuando $p < 0.01$, *** cuando $p < 0.001$ y **** cuando $p < 0.0001$.

BIBLIOGRAFÍA



1. Agircan, F. G., Schiebel, E. and Mardin, B. R. (2014) 'Separate to operate: control of centrosome positioning and separation', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1650), p. 20130461. doi: 10.1098/rstb.2013.0461.
2. Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2008) 'Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 9(4), pp. 309–322. doi: 10.1038/nrm2369.
3. Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2015) 'Control of microtubule organization and dynamics: Two ends in the limelight', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm4084.
4. Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2019) 'Microtubule minus-end regulation at a glance', *Journal of cell science*. doi: 10.1242/jcs.227850.
5. Albert, T. B. (2015) 'The elephant in the room', *Journal of Environmental Law and Litigation*.
6. Alushin, G. M. *et al.* (2014) 'High-Resolution Microtubule Structures Reveal the Structural Transitions in $\alpha\beta$ -Tubulin upon GTP Hydrolysis', *Cell*, 157(5), pp. 1117–1129. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.053.
7. Amin, M. A., Agarwal, S. and Varma, D. (2019) 'Mapping the kinetochore MAP functions required for stabilizing microtubule attachments to chromosomes during metaphase', *Cytoskeleton*. doi: 10.1002/cm.21559.
8. Andersen, J. S. *et al.* (2003) 'Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling', *Nature*. doi: 10.1038/nature02166.
9. Arquint, C. *et al.* (2015) 'STIL binding to Polo-box 3 of PLK4 regulates centriole duplication', *eLife*, 4. doi: 10.7554/eLife.07888.
10. Arquint, C., Gabryjonczyk, A. M. and Nigg, E. A. (2014) 'Centrosomes as signalling centres', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rstb.2013.0464.
11. Arquint, C. and Nigg, E. A. (2014) 'STIL microcephaly mutations interfere with APC/C-mediated degradation and cause centriole amplification', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2013.12.016.
12. Arquint, C. and Nigg, E. A. (2016) 'The PLK4-STIL-SAS-6 module at the core of centriole duplication.', *Biochemical Society transactions*, 44(5), pp. 1253–1263. doi: 10.1042/BST20160116.
13. Ayala, I. and Colanzi, A. (2017) 'Mitotic inheritance of the Golgi complex and its role in cell division', *Biology of the Cell*. doi: 10.1111/boc.201700032.
14. Azimzadeh, J. and Bornens, M. (2007) 'Structure and duplication of the centrosome', *Journal of Cell Science*, 120(13), pp. 2139–2142. doi: 10.1242/jcs.005231.
15. Baala, L. *et al.* (2007) 'Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis', *Nature Genetics*. doi: 10.1038/ng1993.
16. Bakhom, S. F. *et al.* (2009) 'Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1809.
17. Banterle, N. O. and Onczy, P. G. " (2017) 'Annual Review of Cell and Developmental Biology Centriole Biogenesis: From Identifying the Characters to Understanding the Plot', *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616.
18. Barr, A. R., Kilmartin, J. V. and Gergely, F. (2010) 'CDK5RAP2 functions in centrosome to spindle pole attachment and DNA damage response', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200912163.
19. Barrera, J. A. *et al.* (2010) 'CDK5RAP2 regulates centriole engagement and cohesion in mice', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.017.
20. Basto, R. *et al.* (2006) 'Flies without Centrioles', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.025.
21. Baumbach, J. *et al.* (2015) 'Dissecting the Function and Assembly of Acentriolar Microtubule Organizing Centers in Drosophila Cells In Vivo', *PLoS Genetics*. doi: 10.1371/journal.pgen.1005261.

22. Bond, J. *et al.* (2005) 'A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size', *Nature Genetics*. doi: 10.1038/ng1539.
23. Bornens, M. *et al.* (1987) 'Structural and chemical characterization of isolated centrosomes', *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 8(3), pp. 238–249. doi: 10.1002/cm.970080305.
24. Bornens, M. (2002) 'Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms.', *Current opinion in cell biology*, 14(1), pp. 25–34.
25. Bornens, M. (2012) 'The Centrosome in Cells and Organisms', *Science*, 335(6067), pp. 422–426. doi: 10.1126/science.1209037.
26. Bornens, M. and Gönczy, P. (2014) 'Centrosomes back in the limelight.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1650), p. 20130452. doi: 10.1098/rstb.2013.0452.
27. Bouguenina, H. *et al.* (2017) 'EB1-binding–myomegalin protein complex promotes centrosomal microtubules functions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1705682114.
28. Van Breugel, M. *et al.* (2011) 'Structures of SAS-6 suggest its organization in centrioles', *Science*. doi: 10.1126/science.1199325.
29. Brouhard, G. J. *et al.* (2008) 'XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.043.
30. Buchman, J. J. *et al.* (2010) 'Cdk5rap2 interacts with pericentrin to maintain the neural progenitor pool in the developing neocortex', *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2010.03.036.
31. Bugnard, E., Zaal, K. J. M. and Ralston, E. (2005) 'Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation', *Cell Motility and the Cytoskeleton*. doi: 10.1002/cm.20042.
32. Burkhardt, J. K. *et al.* (1997) 'Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.139.2.469.
33. Burute, M. *et al.* (2017) 'Polarity Reversal by Centrosome Repositioning Primes Cell Scattering during Epithelial-to-Mesenchymal Transition', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2016.12.004.
34. Casenghi, M. *et al.* (2003) 'Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00193-X.
35. Cecilia Larocca, M., Jin, M. and Goldenring, J. R. (2006) 'AKAP350 modulates microtubule dynamics', *European Journal of Cell Biology*. doi: 10.1016/j.ejcb.2005.10.008.
36. Chabin-Brion, K. *et al.* (2001) 'The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.12.7.2047.
37. Chapman, M. A. *et al.* (2014) 'Disruption of both nesprin 1 and desmin results in nuclear anchorage defects and fibrosis in skeletal muscle', *Human Molecular Genetics*. doi: 10.1093/hmg/ddu310.
38. Charrasse, S. *et al.* (1995) 'Characterization of the cDNA and Pattern of Expression of a New Gene Over-Expressed in Human Hepatomas and Colonic Tumors', *European Journal of Biochemistry*. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.406_b.x.
39. Chen, C. T. *et al.* (2014) 'A Unique Set of Centrosome Proteins Requires Pericentrin for Spindle-Pole Localization and Spindle Orientation', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2014.08.029.
40. Chinen, T. *et al.* (2015) 'The γ -tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms9722.
41. Ching, Y. P., Qi, Z. and Wang, J. H. (2000) 'Cloning of three novel neuronal Cdk5 activator binding proteins', *Gene*. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00499-0.
42. Choi, Y. K. *et al.* (2010) 'CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the γ -tubulin ring complex',

- Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201007030.
43. Chrétien, D. and Wade, R. H. (1991) 'New data on the microtubule surface lattice.', *Biology of the cell*, 71(1–2), pp. 161–74.
 44. Chuang, M. *et al.* (2014) 'The microtubule minus-end-binding protein patronin/ PTRN-1 is required for axon regeneration in *C. elegans*', *Cell Reports*. doi: 10.1016/j.celrep.2014.09.054.
 45. Cianfrocco, M. A. *et al.* (2015) 'Mechanism and Regulation of Cytoplasmic Dynein', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125438.
 46. Cizmecioglu, O. *et al.* (2010) 'Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome.', *The Journal of cell biology*, 191(4), pp. 731–9. doi: 10.1083/jcb.201007107.
 47. Clarke, P. R. and Zhang, C. (2008) 'Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm2410.
 48. Cole, N. B. *et al.* (1996) 'Golgi dispersal during microtubule disruption: Regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.7.4.631.
 49. Colledge, M. and Scott, J. D. (1999) 'AKAPs: From structure to function', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/S0962-8924(99)01558-5.
 50. Conduit, P. T. *et al.* (2010) 'Centrioles regulate centrosome size by controlling the rate of Cnn incorporation into the PCM', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2010.11.011.
 51. Conduit, P. T. *et al.* (2014) 'The centrosome-specific phosphorylation of Cnn by Polo/Plk1 drives Cnn scaffold assembly and centrosome maturation', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2014.02.013.
 52. Cota, R. R. *et al.* (2017) 'MZT1 regulates microtubule nucleation by linking γ TuRC assembly to adapter-mediated targeting and activation', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.195321.
 53. Cottee, M. A. *et al.* (2013) 'Crystal structures of the CPAP/STIL complex reveal its role in centriole assembly and human microcephaly', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.01071.
 54. Dammermann, A. and Merdes, A. (2002) 'Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200204023.
 55. Decker, M. *et al.* (2011) 'Limiting amounts of centrosome material set centrosome size in *C. elegans* embryos', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2011.06.002.
 56. Dehmelt, L. and Halpain, S. (2005) 'The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins', *Genome Biology*. doi: 10.1186/gb-2004-6-1-204.
 57. Delgehyr, N., Sillibourne, J. and Bornens, M. (2005) 'Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.02302.
 58. Derivery, E. *et al.* (2015) 'Polarized endosome dynamics by spindle asymmetry during asymmetric cell division', *Nature*. doi: 10.1038/nature16443.
 59. Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997) 'MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13(1), pp. 83–117. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.83.
 60. Diviani, D. *et al.* (2011) 'A-kinase anchoring proteins: Scaffolding proteins in the heart', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. doi: 10.1152/ajpheart.00569.2011.
 61. Dobbelaere, J. *et al.* (2008) 'A genome-wide RNAi screen to dissect centriole duplication and centrosome maturation in *Drosophila*', *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.0060224.
 62. Dong, Z. *et al.* (2015) 'Wnt/ β -catenin pathway involvement in ionizing radiation-induced invasion of U87 glioblastoma cells', *Strahlentherapie und Onkologie*. doi: 10.1007/s00066-015-0858-7.
 63. Doxsey, S. J. *et al.* (1994) 'Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization', *Cell*. doi: 10.1016/0092-8674(94)90504-5.

64. Dumontet, C. and Jordan, M. A. (2010) 'Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics', *Nature Reviews Drug Discovery*. doi: 10.1038/nrd3253.
65. Dupree, P. and Sherrier, D. J. (1998) 'The plant Golgi apparatus', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. doi: 10.1016/S0167-4889(98)00061-5.
66. Dyachuk, V., Bierkamp, C. and Merdes, A. (2016) 'Non-centrosomal microtubule organization in differentiated cells', in *The Microtubule Cytoskeleton: Organisation, Function and Role in Disease*. doi: 10.1007/978-3-7091-1903-7_2.
67. Dzhindzhev, N. S. *et al.* (2017) 'Two-step phosphorylation of Ana2 by Plk4 is required for the sequential loading of Ana2 and Sas6 to initiate procentriole formation', *Open Biology*, 7(12), p. 170247. doi: 10.1098/rsob.170247.
68. Efimov, A. *et al.* (2007) 'Asymmetric CLASP-Dependent Nucleation of Noncentrosomal Microtubules at the trans-Golgi Network', *Developmental Cell*, 12(6), pp. 917–930. doi: 10.1016/j.devcel.2007.04.002.
69. Ertych, N. *et al.* (2014) 'Increased microtubule assembly rates influence chromosomal instability in colorectal cancer cells', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2994.
70. Eshun-Wilson, L. *et al.* (2019) 'Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1900441116.
71. Espigat-Georger, A. *et al.* (2016) 'Nuclear alignment in myotubes requires centrosome proteins recruited by nesprin-1', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.191767.
72. Etienne-Manneville, S. (2013) 'Microtubules in Cell Migration', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155711.
73. Evans, K. J. *et al.* (2005) 'Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200409058.
74. Evans, P. D., Vallender, E. J. and Lahn, B. T. (2006) 'Molecular evolution of the brain size regulator genes CDK5RAP2 and CENPJ', *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2006.02.019.
75. Fant, X. *et al.* (2009) 'Nuclei of non-muscle cells bind centrosome proteins upon fusion with differentiating myoblasts', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0008303.
76. Farina, F. *et al.* (2016) 'The centrosome is an actin-organizing centre', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3285.
77. Firat-Karalar, E. N. and Stearns, T. (2014) 'The centriole duplication cycle', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1650), p. 20130460. doi: 10.1098/rstb.2013.0460.
78. Flor-Parra, I., Iglesias-Romero, A. B. and Chang, F. (2018) 'The XMAP215 Ortholog Alp14 Promotes Microtubule Nucleation in Fission Yeast', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2018.04.008.
79. Fong, K. W. *et al.* (2008) 'CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the γ -tubulin ring complex', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E07-04-0371.
80. Fong, K. W. *et al.* (2009) 'Interaction of CDK5RAP2 with EB1 to track growing microtubule tips and to regulate microtubule dynamics', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E09-01-0009.
81. Fry, A. M. *et al.* (1998) 'C-Nap1, a Novel Centrosomal Coiled-Coil Protein and Candidate Substrate of the Cell Cycle-regulated Protein Kinase Nek2', *The Journal of Cell Biology*, 141(7), pp. 1563–1574. doi: 10.1083/jcb.141.7.1563.
82. Fu, J. and Glover, D. M. (2012) 'Structured illumination of the interface between centriole and pericentriolar material', *Open Biology*. doi: 10.1098/rsob.120104.
83. Fu, J., Hagan, I. M. and Glover, D. M. (2015) 'The centrosome and its duplication cycle', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. doi: 10.1101/cshperspect.a015800.
84. Gavilan, M. P. *et al.* (2015) 'Alpha-catenin-Dependent Recruitment of the Centrosomal Protein CAP350

- to Adherens Junctions Allows Epithelial Cells to Acquire a Columnar Shape', *PLoS Biology*. doi: 10.1371/journal.pbio.1002087.
85. Gillingham, A. K. and Munro, S. (2000) 'The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin', *EMBO Reports*. doi: 10.1093/embo-reports/kvd105.
 86. Gimpel, P. *et al.* (2017) 'Nesprin-1 α -Dependent Microtubule Nucleation from the Nuclear Envelope via Akap450 Is Necessary for Nuclear Positioning in Muscle Cells', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2017.08.031.
 87. Giustiniani, J. *et al.* (2009) 'Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53', *Cellular Signalling*. doi: 10.1016/j.cell-sig.2008.12.004.
 88. Gomez-Ferreria, M. A. *et al.* (2007) 'Human Cep192 Is Required for Mitotic Centrosome and Spindle Assembly', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2007.10.019.
 89. Gomez-Ferreria, M. A. *et al.* (2012) 'Novel NEDD1 phosphorylation sites regulate γ -tubulin binding and mitotic spindle assembly', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.105130.
 90. Gönczy, P. (2012) 'Towards a molecular architecture of centriole assembly', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(7), pp. 425–435. doi: 10.1038/nrm3373.
 91. Gopalakrishnan, J. *et al.* (2011) 'Sas-4 provides a scaffold for cytoplasmic complexes and tethers them in a centrosome', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms1367.
 92. Gosavi, P. and Gleeson, P. A. (2017) 'The Function of the Golgi Ribbon Structure - An Enduring Mystery Unfolds!', *BioEssays*. John Wiley & Sons, Ltd, 39(11), p. 1700063. doi: 10.1002/bies.201700063.
 93. Goshima, G. *et al.* (2008) 'Augmin: A protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200711053.
 94. Graser, S. *et al.* (2007) 'Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation.', *The Journal of cell biology*, 179(2), pp. 321–30. doi: 10.1083/jcb.200707181.
 95. Griffith, E. *et al.* (2008) 'Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling', *Nature Genetics*. doi: 10.1038/ng.2007.80.
 96. Groen, A. C. *et al.* (2004) 'XRHAMM functions in ran-dependent microtubule nucleation and pole formation during anastral spindle assembly', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2004.10.002.
 97. Guichard, P., Hamel, V. and Gönczy, P. (2018) 'The Rise of the Cartwheel: Seeding the Centriole Organelle', *BioEssays*. John Wiley & Sons, Ltd, 40(4), p. 1700241. doi: 10.1002/bies.201700241.
 98. Gutiérrez-Caballero, C. *et al.* (2015) 'TACC3-ch-TOG track the growing tips of microtubules independently of clathrin and Aurora-A phosphorylation', *Biology Open*. doi: 10.1242/bio.201410843.
 99. Habedanck, R. *et al.* (2005) 'The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1320.
 100. Hanafusa, H. *et al.* (2015) 'PLK1-dependent activation of LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3204.
 101. Harada, A. *et al.* (1998) 'Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.141.1.51.
 102. Haren, L. *et al.* (2006) 'NEDD1-dependent recruitment of the γ -tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200510028.
 103. Haren, L., Stearns, T. and Lüders, J. (2009) 'Plk1-dependent recruitment of γ -tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0005976.
 104. Hatch, E. M. *et al.* (2010) 'Cep152 interacts with Plk4 and is required for centriole duplication.', *The Journal of cell biology*, 191(4), pp. 721–9. doi: 10.1083/jcb.201006049.

105. Hawes, C. and Satiat-Jeunemaitre, B. (2005) 'The plant Golgi apparatus--going with the flow.', *Biochimica et biophysica acta*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.03.009.
106. Hayward, D. *et al.* (2014) 'Synergy between Multiple Microtubule-Generating Pathways Confers Robustness to Centrosome-Driven Mitotic Spindle Formation', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2013.12.001.
107. He, R. *et al.* (2013) 'LRRC45 is a centrosome linker component required for centrosome cohesion.', *Cell reports*, 4(6). doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.005.
108. Hendershott, M. C. and Vale, R. D. (2014) 'Regulation of microtubule minus-end dynamics by CAMSAPs and Patronin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1404133111.
109. Hirano, T. (2005) 'SMC proteins and chromosome mechanics: From bacteria to humans', in *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rstb.2004.1606.
110. Hirono, M. (2014) 'Cartwheel assembly', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1650), p. 20130458. doi: 10.1098/rstb.2013.0458.
111. Hohmann and Dehghani (2019) 'The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork', *Cells*. doi: 10.3390/cells8040362.
112. Hsia, K. C. *et al.* (2014) 'Reconstitution of the augmin complex provides insights into its architecture and function', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3030.
113. Hug, N., Longman, D. and Cáceres, J. F. (2015) 'Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway', *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkw010.
114. Hurtado, L. *et al.* (2011) 'Disconnecting the Golgi ribbon from the centrosome prevents directional cell migration and ciliogenesis', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201011014.
115. Ignacio, D. P., Coffman, V. C. and Dawes, A. T. (2019) 'Centriole Biogenesis: Symmetry Breaking and Site Selection', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Current Trends, 29(1), pp. 3–5. doi: 10.1016/J.TCB.2018.11.001.
116. Infante, C. *et al.* (1999) 'Gmap-210, a cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.145.1.83.
117. Ishikawa, H. *et al.* (2005) 'Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia.', *Nature cell biology*, 7(5), pp. 517–24. doi: 10.1038/ncb1251.
118. Ito, D. *et al.* (2019) 'Pericentrin-mediated SAS-6 recruitment promotes centriole assembly', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.41418.
119. Jana, S. C., Marteil, G. and Bettencourt-Dias, M. (2014) 'Mapping molecules to structure: unveiling secrets of centriole and cilia assembly with near-atomic resolution.', 26, pp. 96–106. doi: 10.1016/j.ceb.2013.12.001.
120. Janke, C. (2014) 'The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, functions', *Journal of Cell Biology*, 206(4), pp. 461–472. doi: 10.1083/jcb.201406055.
121. Jayaraman, D., Bae, B.-I. and Walsh, C. A. (2018) 'The Genetics of Primary Microcephaly', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. doi: 10.1146/annurev-genom-083117-021441.
122. Jiang, K. *et al.* (2014) 'Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2014.01.001.
123. Jiang, K. *et al.* (2018) 'Structural Basis of Formation of the Microtubule Minus-End-Regulating CAMSAP-Katanin Complex', *Structure*. doi: 10.1016/j.str.2017.12.017.
124. Johmura, Y. *et al.* (2011) 'Regulation of microtubule-based microtubule nucleation by mammalian polo-like kinase 1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1106223108.
125. Joukov, V., Walter, J. C. and De Nicolo, A. (2014) 'The Cep192-Organized Aurora A-Plk1 Cascade Is Essential

- for Centrosome Cycle and Bipolar Spindle Assembly', *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.016.
126. Keith, C. H., Feramisco, J. R. and Shelanski, M. (1981) 'Direct visualization of fluorescein-labeled microtubules in vitro and in microinjected fibroblasts', *The Journal of Cell Biology*, 88(1), pp. 234–240. doi: 10.1083/jcb.88.1.234.
 127. Képès, F., Rambourg, A. and Satiat-Jeunemaître, B. (2004) 'Morphodynamics of the secretory pathway', *International Review of Cytology*. doi: 10.1016/S0074-7696(04)42002-6.
 128. Keryer, G. *et al.* (1993) 'A high-affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II in the centrosome of human cells', *Experimental Cell Research*. doi: 10.1006/excr.1993.1029.
 129. Keryer, G. *et al.* (2003) 'Dissociating the centrosomal matrix protein AKAP450 from centrioles impairs centriole duplication and cell cycle progression', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E02-09-0614.
 130. Kim, H. S. *et al.* (2007) 'Recruitment of CG-NAP to the Golgi apparatus through interaction with dynein-dynactin complex', *Genes to Cells*. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01055.x.
 131. Kim, J., Lee, K. and Rhee, K. (2015) 'PLK1 regulation of PCNT cleavage ensures fidelity of centriole separation during mitotic exit', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms10076.
 132. Kim, Jaeyoun, Kim, Jeongjin and Rhee, K. (2019) 'PCNT is critical for the association and conversion of centrioles to centrosomes during mitosis', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.225789.
 133. Kim, Sunghwan, Kim, Sungjae and Rhee, K. (2011) 'NEK7 is essential for centriole duplication and centrosomal accumulation of pericentriolar material proteins in interphase cells', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.078089.
 134. Kim, T.-S. *et al.* (2013) 'Hierarchical recruitment of Plk4 and regulation of centriole biogenesis by two centrosomal scaffolds, Cep192 and Cep152.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(50), pp. E4849-57. doi: 10.1073/pnas.1319656110.
 135. Kita, K. *et al.* (2006) 'Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E05-06-0498.
 136. Kitagawa, D. *et al.* (2011) 'Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.008.
 137. Kochanski, R. S. and Borisy, G. G. (1990) 'Mode of centriole duplication and distribution', *The Journal of Cell Biology*, 110(5), pp. 1599–1605. doi: 10.1083/jcb.110.5.1599.
 138. Kodani, A. *et al.* (2013) 'Kif3a interacts with Dynactin subunit p150 Glued to organize centriole subdistal appendages', *The EMBO journal*, 32(4), pp. 597–607. doi: 10.1038/emboj.2013.3.
 139. Kollman, J. M. *et al.* (2008) 'The structure of the γ -tubulin small complex: Implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E07-09-0879.
 140. Kollman, J. M. *et al.* (2010) 'Microtubule nucleating γ 3-TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry', *Nature*. doi: 10.1038/nature09207.
 141. Kollman, J. M. *et al.* (2015) 'Ring closure activates yeast γ TuRC for species-specific microtubule nucleation', *Nature Structural and Molecular Biology*. doi: 10.1038/nsmb.2953.
 142. Kolobova, E. *et al.* (2017) 'The C-terminal region of A-kinase anchor protein 350 (AKAP350A) enables formation of microtubule-nucleation centers and interacts with pericentriolar proteins', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M117.806018.
 143. Komarova, Y. *et al.* (2009) 'Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200807179.
 144. Kondylis, V. *et al.* (2001) 'Biogenesis of golgi stacks in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*', *Mole-*

- cular Biology of the Cell. doi: 10.1091/mbc.12.8.2308.
145. Kondylis, V. and Rabouille, C. (2003) 'A novel role for dp115 in the organization of tER sites in *Drosophila*', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200301136.
 146. Konishi, Y. and Setou, M. (2009) 'Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons', *Nature Neuroscience*. doi: 10.1038/nn.2314.
 147. Kraemer, N. *et al.* (2011) 'What's the hype about CDK5RAP2?', *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi: 10.1007/s00018-011-0635-4.
 148. Kratz, A.-S. *et al.* (2015) 'Plk4-dependent phosphorylation of STIL is required for centriole duplication', *Biology open*, 4(3), pp. 370–7. doi: 10.1242/bio.201411023.
 149. Kreis, T. E. (1987) 'Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic.', *The EMBO journal*, 6(9), pp. 2597–606.
 150. Kuijpers, M. and Hoogenraad, C. C. (2011) 'Centrosomes, microtubules and neuronal development', *Molecular and Cellular Neuroscience*. doi: 10.1016/j.mcn.2011.05.004.
 151. Lancaster, M. A. *et al.* (2013) 'Cerebral organoids model human brain development and microcephaly', *Nature*. doi: 10.1038/nature12517.
 152. Lawo, S. *et al.* (2012) 'Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2591.
 153. Lechler, T. and Fuchs, E. (2007) 'Desmoplakin: An unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200609109.
 154. Lee, K. and Rhee, K. (2011) 'PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201106093.
 155. Lee, K. and Rhee, K. (2012) 'Separase-dependent cleavage of pericentrin B is necessary and sufficient for centriole disengagement during mitosis', *Cell Cycle*. doi: 10.4161/cc.20878.
 156. Lee, S. and Rhee, K. (2010) 'CEP215 is involved in the dynein-dependent accumulation of pericentriolar matrix proteins for spindle pole formation', *Cell Cycle*. doi: 10.4161/cc.9.4.10667.
 157. Lee, Y. L. *et al.* (2017) 'Nesprin-1 recruits Akap450-mediated microtubule nucleation activity to the nuclear envelope to facilitate proper nuclear migration in skeletal muscle', *Mechanisms of Development*. doi: 10.1016/j.mod.2017.04.137.
 158. Lerit, D. A. *et al.* (2015) 'Interphase centrosome organization by the PLP-Cnn scaffold is required for centrosome function', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201503117.
 159. Lerit, D. A. and Rusan, N. M. (2013) 'PLP inhibits the activity of interphase centrosomes to ensure their proper segregation in stem cells', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201303141.
 160. Lin, T. C. *et al.* (2014) 'Cell-cycle dependent phosphorylation of yeast pericentrin regulates γ -TUSC-mediated microtubule nucleation', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.02208.
 161. Lončarek, J., Hergert, P. and Khodjakov, A. (2010) 'Centriole Reduplication during Prolonged Interphase Requires Procentriole Maturation Governed by Plk1', *Current Biology*, 20(14), pp. 1277–1282. doi: 10.1016/j.cub.2010.05.050.
 162. Lopes, C. A. M. *et al.* (2015) 'PLK4 trans-Autoactivation Controls Centriole Biogenesis in Space.', *Developmental cell*, 35(2), pp. 222–35. doi: 10.1016/j.devcel.2015.09.020.
 163. Lüders, J. (2018) 'XMAP215 joins microtubule nucleation team', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/s41556-018-0100-9.
 164. Lüders, J., Patel, U. K. and Stearns, T. (2006) 'GCP-WD is a γ -tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1349.
 165. Lüders, J. and Stearns, T. (2007) 'Microtubule-organizing centres: a re-evaluation', *Nature Reviews Mo-*

- molecular Cell Biology*, 8(2), pp. 161–167. doi: 10.1038/nrm2100.
166. Luo, Y. and Pelletier, L. (2014) 'Pericentrin: Critical for spindle orientation', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2014.08.062.
 167. Ma, W. and Viveiros, M. M. (2014) 'Depletion of pericentrin in mouse oocytes disrupts microtubule organizing center function and meiotic spindle organization', *Molecular Reproduction and Development*. doi: 10.1002/mrd.22422.
 168. Mahen, R. *et al.* (2011) 'Continuous polo-like kinase 1 activity regulates diffusion to maintain centrosome self-organization during mitosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1101112108.
 169. Maia, A. R. R. *et al.* (2013) 'Modulation of Golgi-associated microtubule nucleation throughout the cell cycle', *Cytoskeleton*. doi: 10.1002/cm.21079.
 170. Malikov, V. *et al.* (2005) 'Centering of a radial microtubule array by translocation along microtubules spontaneously nucleated in the cytoplasm', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1332.
 171. Manning, J. A. *et al.* (2010) 'A direct interaction with NEDD1 regulates γ -tubulin recruitment to the centrosome', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0009618.
 172. Maro, B. *et al.* (1986) 'Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: An interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane', *Journal of Embryology and Experimental Morphology*.
 173. Marthiens, V. *et al.* (2013) 'Centrosome amplification causes microcephaly', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2746.
 174. Martin, C. A. *et al.* (2014) 'Mutations in PLK4, encoding a master regulator of centriole biogenesis, cause microcephaly, growth failure and retinopathy', *Nature Genetics*. doi: 10.1038/ng.3122.
 175. Matsuo, K. *et al.* (2012) 'Kendrin is a novel substrate for separase involved in the licensing of centriole duplication', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.048.
 176. Mattaloni, S. M. *et al.* (2013) 'Centrosomal AKAP350 modulates the G1/S transition', *Cellular Logistics*. doi: 10.4161/cl.26331.
 177. Maurer, S. P. *et al.* (2014) 'EB1 accelerates two conformational transitions important for microtubule maturation and dynamics', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2013.12.042.
 178. Mayor, T. *et al.* (2002) 'The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles', *Journal of cell science*, 115(Pt 16), pp. 3275–84.
 179. Megraw, T. L., Sharkey, J. T. and Nowakowski, R. S. (2011) 'Cdk5rap2 exposes the centrosomal root of microcephaly syndromes', *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2011.04.007.
 180. Meitinger, F. *et al.* (2016) '53BP1 and USP28 mediate p53 activation and G1 arrest after centrosome loss or extended mitotic duration', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201604081.
 181. Mennella, V. *et al.* (2012) 'Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2597.
 182. Millarte, V. and Farhan, H. (2012) 'The Golgi in cell migration: Regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis', *The Scientific World Journal*. doi: 10.1100/2012/498278.
 183. Miller, P. M. *et al.* (2009) 'Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb1920.
 184. Minc, N., Burgess, D. and Chang, F. (2011) 'Influence of cell geometry on division-plane positioning', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.016.
 185. Mishra, R. K. *et al.* (2010) 'The Nup107-160 complex and γ -TuRC regulate microtubule polymerization at kinetochores', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb2016.

186. Mitchison, T. (1993) 'Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules', *Science*, 261(5124), pp. 1044–1047. doi: 10.1126/science.8102497.
187. Mogensen, M. M. *et al.* (2017) 'Ninein is essential for apico-basal microtubule formation and CLIP-170 facilitates its redeployment to non-centrosomal microtubule organizing centres', *Open Biology*. doi: 10.6084/m9.
188. Moores, C. A. *et al.* (2006) 'Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/sj.emboj.7601335.
189. Moudjou, M. *et al.* (1996) 'γ-Tubulin in mammalian cells: The centrosomal and the cytosolic forms', *Journal of Cell Science*, 109 (Pt 4, pp. 875–87.
190. Mourey, L. *et al.* (2011) 'Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(11), pp. 709–721. doi: 10.1038/nrm3209.
191. Moyer, T. C. *et al.* (2015) 'Binding of STIL to Plk4 activates kinase activity to promote centriole assembly', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 209(6), pp. 863–78. doi: 10.1083/jcb.201502088.
192. Mühlhans, J. and Gießl, A. (2012) 'Pericentrin in health and disease: Exploring the patchwork of pericentrin splice variants', *Communicative and Integrative Biology*. doi: 10.4161/cib.20363.
193. Muroyama, A. and Lechler, T. (2017) 'Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells', *Development (Cambridge)*. doi: 10.1242/dev.153171.
194. Muroyama, A., Seldin, L. and Lechler, T. (2016) 'Divergent regulation of functionally distinct γ-tubulin complexes during differentiation', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201601099.
195. Nakamura, M., Zhou, X. Z. and Lu, K. P. (2001) 'Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization', *Current Biology*. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00297-4.
196. Nakaoka, Y. *et al.* (2015) 'Cytoplasmic nucleation and atypical branching nucleation generate endoplasmic microtubules in *Physcomitrella patens*', *Plant Cell*. doi: 10.1105/tpc.114.134817.
197. Nano, M. and Basto, R. (2017) 'Consequences of centrosome dysfunction during brain development', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-3-319-57127-0_2.
198. Nigg, E. A. and Holland, A. J. (2018) 'Once and only once: mechanisms of centriole duplication and their deregulation in disease.', *Nature reviews. Molecular cell biology*. NIH Public Access, 19(5), pp. 297–312. doi: 10.1038/nrm.2017.127.
199. Nogales, E. (2001) 'Structural Insights into Microtubule Function', *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 30(1), pp. 397–420. doi: 10.1146/annurev.biophys.30.1.397.
200. Nogales, E., Wolf, S. G. and Downing, K. H. (1998) 'Structure of the αβ tubulin dimer by electron crystallography', *Nature*, 391(6663), pp. 199–203. doi: 10.1038/34465.
201. O'Rourke, B. P. *et al.* (2014) 'Cep192 controls the balance of centrosome and non-centrosomal microtubules during interphase', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0101001.
202. Oakley, C. E. and Oakley, B. R. (1989) 'Identification of gamma-tubulin, a new member of t... [Nature. 1989] - PubMed result', *Nature*. doi: 10.1038/338662a0.
203. Oddoux, S. *et al.* (2013) 'Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at golgi elements', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201304063.
204. Ohi, R. and Zanic, M. (2016) 'Ahead of the Curve: New Insights into Microtubule Dynamics', *F1000Research*. doi: 10.12688/f1000research.7439.1.
205. Ohta, M. *et al.* (2014) 'Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole', *Nature Communications*, 5(1), p. 5267. doi: 10.1038/ncomms6267.
206. Olmsted, J. B. and Borisy, G. G. (1973) 'Microtubules', *Annual Review of Biochemistry*, 42(1), pp. 507–540. doi: 10.1146/annurev.bi.42.070173.002451.

207. Ori-McKenney, K. M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2012) 'Golgi Outposts Shape Dendrite Morphology by Functioning as Sites of Acentrosomal Microtubule Nucleation in Neurons', *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.008.
208. Paintrand, M. *et al.* (1992) 'Centrosome organization and centriole architecture: Their sensitivity to divalent cations', *Journal of Structural Biology*. doi: 10.1016/1047-8477(92)90011-X.
209. Palazzo, R. E. *et al.* (2000) 'Centrosome maturation.', *Current topics in developmental biology*, 49, pp. 449–70.
210. Palmer, K. J., Hughes, H. and Stephens, D. J. (2009) 'Specificity of cytoplasmic dynein subunits in discrete membrane-trafficking steps', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1160.
211. Park, S.-Y. *et al.* (2014) 'Molecular basis for unidirectional scaffold switching of human Plk4 in centriole biogenesis', *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(8), pp. 696–703. doi: 10.1038/nsmb.2846.
212. Paz, J. and Lüders, J. (2018) 'Microtubule-Organizing Centers: Towards a Minimal Parts List', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 28(3), pp. 176–187. doi: 10.1016/j.tcb.2017.10.005.
213. Pearson, C. G. (2014) 'Choosing sides - asymmetric centriole and basal body assembly', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.151761.
214. Petry, S. and Vale, R. D. (2015) 'Microtubule nucleation at the centrosome and beyond', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 17(9), pp. 1089–1093. doi: 10.1038/ncb3220.
215. Peyroche, A. *et al.* (2001) 'The ARF exchange factors Gea1p and Gea2p regulate Golgi structure and function in yeast', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.234336.
216. Piane, M. *et al.* (2009) 'Majewski osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II) syndrome previously diagnosed as Seckel syndrome: Report of a novel mutation of the PCNT gene', *American Journal of Medical Genetics, Part A*. doi: 10.1002/ajmg.a.33035.
217. Piel, M. *et al.* (2000) 'The Respective Contributions of the Mother and Daughter Centrioles to Centrosome Activity and Behavior in Vertebrate Cells', *The Journal of Cell Biology*, 149(2), pp. 317–330. doi: 10.1083/jcb.149.2.317.
218. Pinyol, R., Scrofani, J. and Vernos, I. (2013) 'The role of NEDD1 phosphorylation by aurora a in chromosomal microtubule nucleation and spindle function', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2012.11.046.
219. Pitaval, A. *et al.* (2010) 'Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201004003.
220. Portran, D. *et al.* (2017) 'Tubulin acetylation protects long-lived microtubules against mechanical ageing', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3481.
221. Preuss, D. *et al.* (1992) 'Characterization of the *Saccharomyces* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.3.7.789.
222. Purohit, A. *et al.* (1999) 'Direct interaction of pericentrin with cytoplasmic dynein light intermediate chain contributes to mitotic spindle organization', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.147.3.481.
223. Rale, M. J., Kadzik, R. S. and Petry, S. (2018) 'Phase Transitioning the Centrosome into a Microtubule Nucleator.', *Biochemistry*. NIH Public Access, 57(1), pp. 30–37. doi: 10.1021/acs.biochem.7b01064.
224. Revenkova, E. *et al.* (2001) 'Novel Meiosis-Specific Isoform of Mammalian SMC1', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.21.20.6984-6998.2001.
225. Richens, J. H. *et al.* (2015) 'The drosophila pericentrin-like-protein (PLP) cooperates with Cnn to maintain the integrity of the outer PCM', *Biology Open*. doi: 10.1242/bio.012914.
226. Ríos, R. M. (2014) 'The centrosome-Golgi apparatus nexus.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1650), p. 20130462. doi: 10.1098/rstb.2013.0462.
227. Ríos, R. M. *et al.* (2004) 'GMAP-210 recruits γ -tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.012.

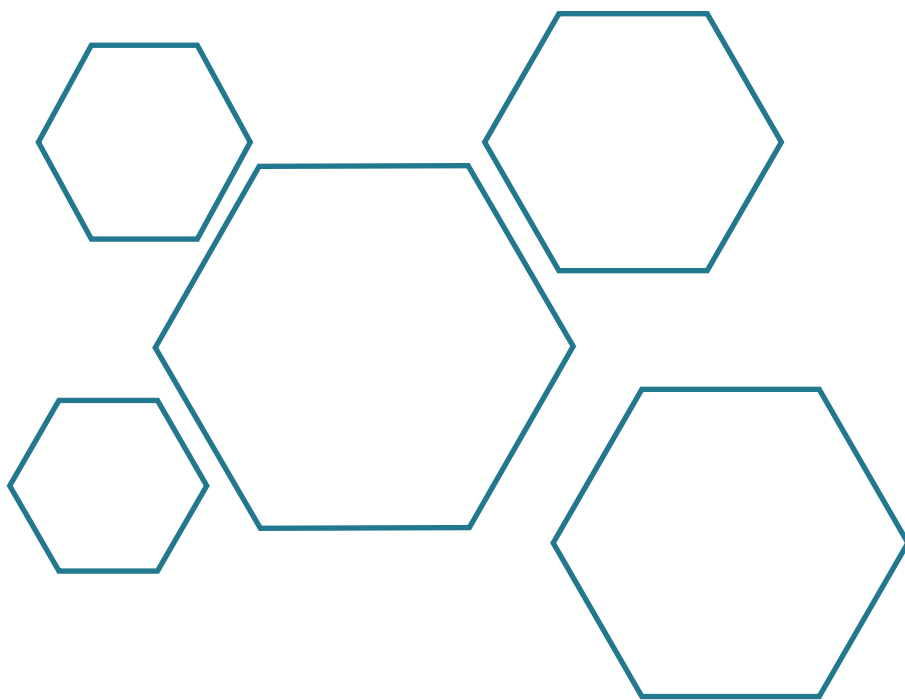
228. Rios, R. M. and Bornens, M. (2003) 'The Golgi apparatus at the cell centre', *Current Opinion in Cell Biology*. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00013-3.
229. Rivero, S. *et al.* (2009) 'Microtubule nucleation at the cis-side of the golgi apparatus requires AKAP450 and GM130', *EMBO Journal*. doi: 10.1038/emboj.2009.47.
230. Roll-Mecak, A. (2015) 'Intrinsically disordered tubulin tails: Complex tuners of microtubule functions?', *Seminars in Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.026.
231. Roostalu, J., Cade, N. I. and Surrey, T. (2015) 'Complementary activities of TPX2 and chTOG constitute an efficient importin-regulated microtubule nucleation module', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3241.
232. Roostalu, J. and Surrey, T. (2017) 'Microtubule nucleation: Beyond the template', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 18(11), pp. 702–710. doi: 10.1038/nrm.2017.75.
233. Roubin, R. *et al.* (2013) 'Myomegalin is necessary for the formation of centrosomal and Golgi-derived microtubules', *Biology Open*. doi: 10.1242/bio.20123392.
234. Sahu, B. S. *et al.* (2019) 'Catestatin regulates vesicular quanta through modulation of cholinergic and peptidergic (PACAPergic) stimulation in PC12 cells', *Cell and Tissue Research*. doi: 10.1007/s00441-018-2956-1.
235. Sánchez-Huertas, C. *et al.* (2016) 'Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms12187.
236. Sanchez, A. D. and Feldman, J. L. (2017) 'Microtubule-organizing centers: from the centrosome to non-centrosomal sites', *Current Opinion in Cell Biology*, 44, pp. 93–101. doi: 10.1016/j.ceb.2016.09.003.
237. Sanders, A. A. W. M. *et al.* (2017) 'Nonrandom γ -TuNA-dependent spatial pattern of microtubule nucleation at the Golgi', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E17-06-0425.
238. Sato, Y. *et al.* (2014) 'MTCL1 crosslinks and stabilizes non-centrosomal microtubules on the Golgi membrane', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms6266.
239. Sawin, K. E., Lourenco, P. C. C. and Snaith, H. A. (2004) 'Microtubule nucleation at non-spindle pole body microtubule-organizing centers requires fission yeast centrosomin-related protein mod20p', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2004.03.042.
240. Schmidt, P. H. *et al.* (1999) 'AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.274.5.3055.
241. Schroer, T. A. (2013) 'Dynactin', in *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*. doi: 10.1016/B978-0-12-378630-2.00423-0.
242. Scrofani, J. *et al.* (2015) 'Microtubule nucleation in mitosis by a RanGTP-dependent protein complex', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2014.11.025.
243. Shahbazi, M. N. *et al.* (2013) 'CLASP2 interacts with p120-catenin and governs microtubule dynamics at adherens junctions', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201306019.
244. Sharp, D. J. and Ross, J. L. (2012) 'Microtubule-severing enzymes at the cutting edge', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.101139.
245. Sir, J. H. *et al.* (2013) 'Loss of centrioles causes chromosomal instability in vertebrate somatic cells', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201309038.
246. Soediono, B. (1989) 'Alberts - Molecular Biology Of The Cell 4th Ed', *Journal of Chemical Information and Modeling*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
247. Song, Y. and Brady, S. T. (2015) *Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules*, *Trends in Cell Biology*. doi: 10.1016/j.tcb.2014.10.004.
248. Sonnen, K. F. *et al.* (2012) '3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architectu-

- re of human centrosomes', *Biology Open*. doi: 10.1242/bio.20122337.
249. Sonnen, K. F. *et al.* (2013) 'Human Cep192 and Cep152 cooperate in Plk4 recruitment and centriole duplication', *Journal of Cell Science*, 126(14), pp. 3223–3233. doi: 10.1242/jcs.129502.
 250. Stiess, M. *et al.* (2010) 'Axon extension occurs independently of centrosomal microtubule nucleation', *Science*. doi: 10.1126/science.1182179.
 251. Strnad, P. *et al.* (2007) 'Regulated HsSAS-6 levels ensure formation of a single procentriole per centriole during the centrosome duplication cycle.', *Developmental cell*, 13(2), pp. 203–13. doi: 10.1016/j.devcel.2007.07.004.
 252. Stroud, M. J. *et al.* (2017) 'Nesprin 1 α 2 is essential for mouse postnatal viability and nuclear positioning in skeletal muscle', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201612128.
 253. Subramanian, R. and Kapoor, T. M. (2012) 'Building Complexity: Insights into Self-Organized Assembly of Microtubule-Based Architectures', *Developmental Cell*, 23(5), pp. 874–885. doi: 10.1016/j.devcel.2012.10.011.
 254. Sulimenko, V. *et al.* (2017) 'Regulation of microtubule nucleation mediated by γ -tubulin complexes', *Protoplasma*. Protoplasma, 254(3), pp. 1187–1199. doi: 10.1007/s00709-016-1070-z.
 255. Takahashi, M. *et al.* (1999) 'Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the Golgi apparatus', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.274.24.17267.
 256. Takahashi, M. *et al.* (2002) 'Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring γ -tubulin ring complex', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0112.
 257. Tassin, A. M. *et al.* (1985) 'The golgi apparatus remains associated with microtubule organizing centers during myogenesis', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.101.2.630.
 258. Tassin, A. M., Maro, B. and Bornens, M. (1985) 'Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.100.1.35.
 259. Teixidó-Travesa, N. *et al.* (2010) 'The γ TuRC revisited: A comparative analysis of interphase and mitotic human γ TuRC redefines the set of core components and identifies the novel subunit GCP8', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E10-05-0408.
 260. Thawani, A., Kadzik, R. S. and Petry, S. (2018) 'XMAP215 is a microtubule nucleation factor that functions synergistically with the γ -tubulin ring complex', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/s41556-018-0091-6.
 261. Thyberg, J. and Moskalewski, S. (1999) 'Role of microtubules in the organization of the Golgi complex', *Experimental Cell Research*. doi: 10.1006/excr.1998.4326.
 262. Tibelius, A. *et al.* (2009) 'Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.200810159.
 263. Tonucci, F. M. *et al.* (2015) 'Centrosomal AKAP350 and CIP4 act in concert to define the polarized localization of the centrosome and Golgi in migratory cells', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.170878.
 264. Tovey, C. A. and Conduit, P. T. (2018) 'Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes and beyond', *Essays In Biochemistry*, 62(6), pp. 765–780. doi: 10.1042/EBC20180028.
 265. Toya, M. *et al.* (2016) 'CAMSAP3 orients the apical-to-basal polarity of microtubule arrays in epithelial cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1520638113.
 266. Tsou, M.-F. B. *et al.* (2009) 'Polo Kinase and Separase Regulate the Mitotic Licensing of Centriole Duplication in Human Cells', *Developmental Cell*, 17(3), pp. 344–354. doi: 10.1016/j.devcel.2009.07.015.
 267. Uehara, R. *et al.* (2009) 'The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.0901587106.


268. Uzbekov, R. and Prigent, C. (2007) 'Clockwise or anticlockwise? Turning the centriole triplets in the right direction!', *FEBS Letters*. doi: 10.1016/j.febslet.2007.02.069.
269. Verde, I. *et al.* (2001) 'Myomegalin is a Novel Protein of the Golgi/Centrosome That Interacts with a Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M006546200.
270. Verhey, K. J., Kaul, N. and Soppina, V. (2011) 'Kinesin Assembly and Movement in Cells', *Annual Review of Biophysics*. doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155310.
271. Wang, Z. *et al.* (2010) 'Conserved motif of CDK5RAP2 mediates its localization to centrosomes and the Golgi complex', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M110.105965.
272. Wang, Z., Zhang, C. and Qi, R. Z. (2014) 'A newly identified myomegalin isoform functions in Golgi microtubule organization and ER-Golgi transport', *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.155408.
273. Widlund, P. O. *et al.* (2011) 'XMAP215 polymerase activity is built by combining multiple tubulin-binding TOG domains and a basic lattice-binding region', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1016498108.
274. Wieczorek, M. *et al.* (2015) 'Microtubule-associated proteins control the kinetics of microtubule nucleation', *Nature Cell Biology*. doi: 10.1038/ncb3188.
275. Wilson, M. H. and Holzbaur, E. L. F. (2015) 'Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive nuclear distribution in muscle cells', *Development (Cambridge)*. doi: 10.1242/dev.114769.
276. Winey, M. and O'Toole, E. (2014) 'Centriole structure', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1650), p. 20130457. doi: 10.1098/rstb.2013.0457.
277. Wiczak, O. (1999) 'Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450', *The EMBO Journal*. doi: 10.1093/emboj/18.7.1858.
278. Wong, Y. L. *et al.* (2015) 'Cell biology. Reversible centriole depletion with an inhibitor of Polo-like kinase 4.', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 348(6239), pp. 1155–60. doi: 10.1126/science.aaa5111.
279. Woodruff, J. B. *et al.* (2017) 'The Centrosome Is a Selective Condensate that Nucleates Microtubules by Concentrating Tubulin', *Cell*, 169(6), pp. 1066–1077.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.028.
280. Wu, J. *et al.* (2016) 'Molecular Pathway of Microtubule Organization at the Golgi Apparatus', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.009.
281. Wu, J. and Akhmanova, A. (2017) 'Microtubule-Organizing Centers', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1), pp. 51–75. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060615.
282. Yadav, S. and Linstedt, A. D. (2011) 'Golgi positioning', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a005322.
283. Yalgın, C. *et al.* (2015) 'Centrosomin represses dendrite branching by orienting microtubule nucleation', *Nature Neuroscience*. doi: 10.1038/nn.4099.
284. Yan, X., Habedanck, R. and Nigg, E. A. (2006) 'A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E05-08-0810.
285. Yang, C. *et al.* (2017) 'EB1 and EB3 regulate microtubule minus end organization and Golgi morphology', *Journal of Cell Biology*. doi: 10.1083/jcb.201701024.
286. Yang, R. and Feldman, J. L. (2015) 'SPD-2/CEP192 and CDK Are Limiting for Microtubule-Organizing Center Function at the Centrosome', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2015.06.001.
287. Yokoyama, H. *et al.* (2014) 'The nucleoporin MEL-28 promotes RanGTP-dependent γ -tubulin recruitment and microtubule nucleation in mitotic spindle formation', *Nature communications*. doi: 10.1038/ncomms4270.
288. Young, A. *et al.* (2000) 'Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and γ tubulin onto centrosomes', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.11.6.2047.

289. Zaal, K. J. M. *et al.* (2011) 'Who needs microtubules? myogenic reorganization of MTOC, golgi complex and er exit sites persists despite lack of normal microtubule tracks', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0029057.
290. Zhang, Q. *et al.* (2002) 'The nesprins are giant actin-binding proteins, orthologous to *Drosophila melanogaster* muscle protein MSP-300', *Genomics*. doi: 10.1016/S0888-7543(02)96859-X.
291. Zhang, R. *et al.* (2017) 'Structural insight into TPX2-stimulated microtubule assembly', *eLife*. doi: 10.7554/eLife.30959.
292. Zhang, X. *et al.* (2009) 'CDK5RAP2 is required for spindle checkpoint function', *Cell Cycle*. doi: 10.4161/cc.8.8.8205.
293. Zhang, X. *et al.* (2016) 'Cell-Type-Specific Alternative Splicing Governs Cell Fate in the Developing Cerebral Cortex', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.025.
294. Zheng, Y. *et al.* (1995) 'Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex', *Nature*. doi: 10.1038/378578a0.
295. Zhu, F. *et al.* (2008) 'The Mammalian SPD-2 Ortholog Cep192 Regulates Centrosome Biogenesis', *Current Biology*. doi: 10.1016/j.cub.2007.12.055.
296. Zhu, X. *et al.* (2015) 'Microtubules Negatively Regulate Insulin Secretion in Pancreatic β Cells', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2015.08.020.
297. Zhu, X. and Kaverina, I. (2013) 'Golgi as an MTOC: Making microtubules for its own good', *Histochemistry and Cell Biology*. doi: 10.1007/s00418-013-1119-4.
298. Zimmerman, W. C. *et al.* (2004) 'Mitosis-specific anchoring of γ tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry', *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E03-11-0796.
299. Zwicker, D. *et al.* (2014) 'Centrosomes are autocatalytic droplets of pericentriolar material organized by centrioles', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.1404855111.

ANEXO



The dual role of the centrosome in organizing the microtubule network in interphase

Maria P Gavilan^{1,†}, Pablo Gandolfo^{1,†}, Fernando R Balestra¹, Francisco Arias¹, Michel Bornens² & Rosa M Rios^{1,*} 

Abstract

Here, we address the regulation of microtubule nucleation during interphase by genetically ablating one, or two, of three major mammalian γ -TuRC-binding factors namely pericentrin, CDK5Rap2, and AKAP450. Unexpectedly, we find that while all of them participate in microtubule nucleation at the Golgi apparatus, they only modestly contribute at the centrosome where CEP192 has a more predominant function. We also show that inhibiting microtubule nucleation at the Golgi does not affect centrosomal activity, whereas manipulating the number of centrosomes with centrinone modifies microtubule nucleation activity of the Golgi apparatus. In centrosome-free cells, inhibition of Golgi-based microtubule nucleation triggers pericentrin-dependent formation of cytoplasmic-nucleating structures. Further depletion of pericentrin under these conditions leads to the generation of individual microtubules in a γ -tubulin-dependent manner. In all cases, a conspicuous MT network forms. Strikingly, centrosome loss increases microtubule number independently of where they were growing from. Our results lead to an unexpected view of the interphase centrosome that would control microtubule network organization not only by nucleating microtubules, but also by modulating the activity of alternative microtubule-organizing centers.

Keywords AKAP450; centrosome; Golgi apparatus; microtubule nucleation; PCNT

Subject Category Cell Adhesion, Polarity & Cytoskeleton

DOI 10.15252/embr.201845942 | Received 9 February 2018 | Revised 27 August 2018 | Accepted 29 August 2018 | Published online 17 September 2018

EMBO Reports (2018) 19: e45942

Introduction

The centrosome has been traditionally considered as the major microtubule (MT)-organizing center (MTOC) of animal cells. It consists of a pair of centrioles organizing a matrix, the pericentriolar material (PCM), where MT nucleation and anchoring activities are localized [1]. In the last years, it has become increasingly clear that

MT nucleation also takes place in other subcellular locations [2,3]. During interphase, the Golgi apparatus (GA) is an active MTOC in many cell types [4,5], and during mitosis, spindle MTs and kinetochores also act as additional MTOCs [6].

An increasing body of data indicates that MT nucleation activities of the centrosome and the GA are coordinately regulated. For example, during G2-M transition, the centrosome gains MT nucleation activity [7], while MT nucleation activity of the GA is lost [8]. The process is reversed after mitotic exit when MT-nucleating activity of the GA is fully recovered. Down-regulation of centrosome-associated MT nucleation activity, or even centrosome loss, is also observed during cell differentiation [9], while that of the GA becomes dominant, as occurs for example in neurons, skeletal muscles, or pancreatic β -cells [9–13]. The molecular mechanisms underlying the coordination between these two MTOCs remain however mostly unexplored.

Microtubule nucleation primarily relies on γ -tubulin and its associated proteins (GCP2-GCP6). In higher eukaryotes, these proteins form ring-shaped complexes known as γ -TuRCs that serve as scaffolds for tubulin dimers in order to promote MT polymerization [14]. Efficient γ -tubulin-mediated MT nucleation depends however on additional regulatory factors that activate or target γ -TuRCs to MTOCs [15]. Binding of γ -TuRCs to the centrosome appears to be mediated by a large number of factors. Among them, four mammalian proteins, pericentrin (PCNT) and its paralog AKAP450 (also known as AKAP350 or CG-NAP) and CDK5Rap2 (CEP215) and its paralog myomegalin, contain conserved, yet degenerate, motifs for γ -tubulin binding [15] and have been shown to bind γ -tubulin *in vitro* [16–19]. Based on these features, these proteins have been traditionally considered γ -TuRC receptors, and it has been generally assumed that they play a role in MT nucleation at the centrosome. However, direct evidence supporting this view is scarce, especially during interphase. Other centrosomal proteins such as CEP192 [20], MZT1 [21], and NEDD1 [22,23] have also been reported to participate in γ -TuRC recruitment and MT nucleation.

In addition to the centrosome, AKAP450, CDK5Rap2, and myomegalin do also localize at the cis-face of the GA in most cells [19,24–26], whereas PCNT has only been detected at the GA of skeletal muscle fibers so far [11]. The key factor for MT nucleation

¹ Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa CABIMER, Universidad de Sevilla-CSIC-Universidad Pablo de Olavide, Seville, Spain

² UMR144 CNRS-Institut Curie, Paris Cedex 05, France

*Corresponding author. Tel: +34 954467996; E-mail: rosa.rios@cabimer.es

[†]These authors contributed equally to this work

at the GA has been proven to be AKAP450. Indeed, siRNA-driven knock-down, gene knock-out, or dissociation of AKAP450 from the GA completely abolishes Golgi-associated MT nucleation [24,27,28]. CDK5Rap2 and myomegalin, recruited to the GA by AKAP450, appear to facilitate MT assembly by providing MT stabilization/anchoring activities [18,28]. In addition to these players, assembly of Golgi-associated MTs requires the dynein/dynactin complex [24,27] and the MT-binding proteins CLASPs [5]. Other proteins such as microtubule-cross-linking factor 1 (MTCL1) that binds both AKAP450 and CLASPs [29] and calmodulin-regulated spectrin-associated protein family member 2 (CAMSAP2) that binds myomegalin 8 [28] and EBs proteins [30] also participate in the dynamics of GA-nucleated MTs.

How cells specifically regulate GA or centrosome MT nucleation during interphase and how these MT-nucleating activities are coordinated are questions that need to be better understood. Recently, the catalytic subunit of DNA polymerase δ (PolD1) has been shown to bind γ -TuRC and to potentially inhibit γ -TuRC-mediated MT nucleation. Intriguingly, PolD1 regulates MT nucleation at the GA without affecting the centrosome activity [31]. Loss of centrosomes induced by the PLK4 inhibitor centrinone [32] has been reported to increase γ -tubulin recruitment to the GA although, quite surprisingly, MTs at the GA in such conditions remained unperturbed [28].

To gain further insights into a possible crosstalk between the centrosome and the GA, we focused on proteins shared by both organelles, that is, PCNT, AKAP450, and CDK5Rap2. Myomegalin was not included in this analysis since several isoforms are present at the centrosome [19], and suitable tools for a thorough analysis are lacking except for the GA-associated MM8 isoform [28]. We have generated single and double hTERT-RPE1 knock-out (KO) cell lines of the three proteins. The characterization of mutant cell lines has revealed an important role of all these proteins in regulating GA-mediated MT nucleation and only a minor contribution to centrosomal MT nucleation. The latter seems to be more dependent of CEP192 and of uncharacterized mechanisms. We have also used the Plk4-specific inhibitor centrinone to alter centriole number [32]. By combining these tools, we have shown that MT nucleation appears as a hierarchically regulated process, the centrosome controlling MT nucleation at other subcellular locations. Strikingly, in the absence of activity at the two main nucleating centers—the centrosome and the GA—a MT cytoskeleton fills the cell, but is poorly organized. Our results support a model for normal MT network organization in animal cells during interphase, in which the centrosome exerts its nucleating activity while negatively regulates that of the GA and inhibits assembly in the cytosol.

Results

Characterization of CRISPR-Cas9-induced knock-out hTERT-RPE1 cell lines

In order to achieve selective inhibition of MT nucleation either from the GA or the centrosome, we generated single or double hTERT-RPE1 knock-out (KO) cell lines targeting the AKAP450, CDK5Rap2, and/or PCNT/kendrin (PCNT hereafter) proteins. Each of these mutant cell lines was generated by CRISPR/Cas9 nickase-mediated mutagenesis. To improve the efficiency and

specificity of this process, we developed a vector containing two cloning sites for two single guide RNAs (sgRNAs; see Appendix Fig S1A and Materials and Methods for details). These sgRNAs were designed to target the first exons of each protein (exons 2, 1, and 5 for the *akap450*, *cdk5rap2*, and *pcnt* genes, respectively, Appendix Fig S1B). KO cells for each gene were initially identified by immunofluorescence (IF) analysis, and, after clonal expansion, the targeted genomic regions of the selected KO clones were sequenced. Sequence analysis confirmed that the mutations introduced produced premature stop codons in both alleles of the respective gene. The amino acid sequence of the putative truncated polypeptides expressed in the KO clones, if any, is depicted in Appendix Fig S2A–H. However, the generations of these peptides are likely to be negligible since the mRNA expression of these genes was diminished approximately 90% in the KO cells when assessed by qPCR using different pairs of primers for each gene (Fig EV1), consistent with transcript degradation by 5'–3' non-sense-mediated mRNA decay [33]. Notably, the viability of the KO cell lines was not compromised in any way.

At least two KO clones of each mutated gene were selected for further characterization in Western blots (WB) and by IF, using four anti-AKAP450, four anti-PCNT, and three anti-CDK5Rap2 antibodies that recognized epitopes distributed all over the respective protein sequence (see Fig 1A). Although raised against the N-terminal part of AKAP450 (marked Av), the polyclonal anti-AKAP450 Aviva antibody also recognized the third quarter of the protein (marked Av*, see Fig EV1E). The SC3-1 and SC3-2 anti-CDK5Rap2 polyclonal antibodies were generated and characterized in house (see Fig EV2A and B, and Materials and Methods). In WBs probed with any of the antibodies tested, no protein signal was detected in extracts of *akap450* KO (*akap* KO), *pcnt* KO, and *cdk5rap2* KO (*c5rap2* KO) cell lines (Figs 1B and EV2A–C). Similarly, there was no specific IF signal obtained with any of the anti-PCNT or anti-CDK5Rap2 antibodies in KO clones, further demonstrating the loss of both proteins (Figs 1C and EV2E and F). Likewise, no AKAP450 signal was observed in *akap450* KO mutant cells probed with the antibodies recognizing either the N-terminus (named 7/AK), the central part (named A24), or the C-terminus (named Ct-AK) of the protein (Fig EV2D). However, residual centrosomal labeling was detected with the polyclonal Av antiserum, probably due to the cross-reaction of this antiserum with a centrosomal epitope rather than to the expression of a minor centrosomal isoform of the protein. Indeed, the antibody Ct-AK that recognizes the centrosomal targeting sequence did not reveal any signal at the centrosome in KO clones. Moreover, rabbit pre-immune sera frequently contain anti-centrosome antibodies. Finally, the qPCR data also supported this hypothesis. Thus, as far as we can tell, the KO cell lines generated appear to be suitable for our purposes.

To generate the *pcnt/akap450* and *pcnt/cdk5rap2* double KO cell lines, *pcnt* KO cells were transfected with the plasmids used to mutate AKAP450 or CDK5Rap2, respectively. The double KO clones were identified and characterized as above, and both the double *pcnt/akap450* (*pc-ak*-2KO) and *pcnt/cdk5rap2* (*pc-c5*-2KO) KO cells lacked their respective mutated proteins as revealed by IF (Fig 1C) and WB (Fig 1D). As AKAP450, PCNT, and CDK5Rap2 interact *in vivo* [17], the absence of one of them might affect the protein levels of the other proteins. However, depletion of PCNT or CDK5Rap2 alone, or together in the *pcnt/cdk5rap2* KO cells, only

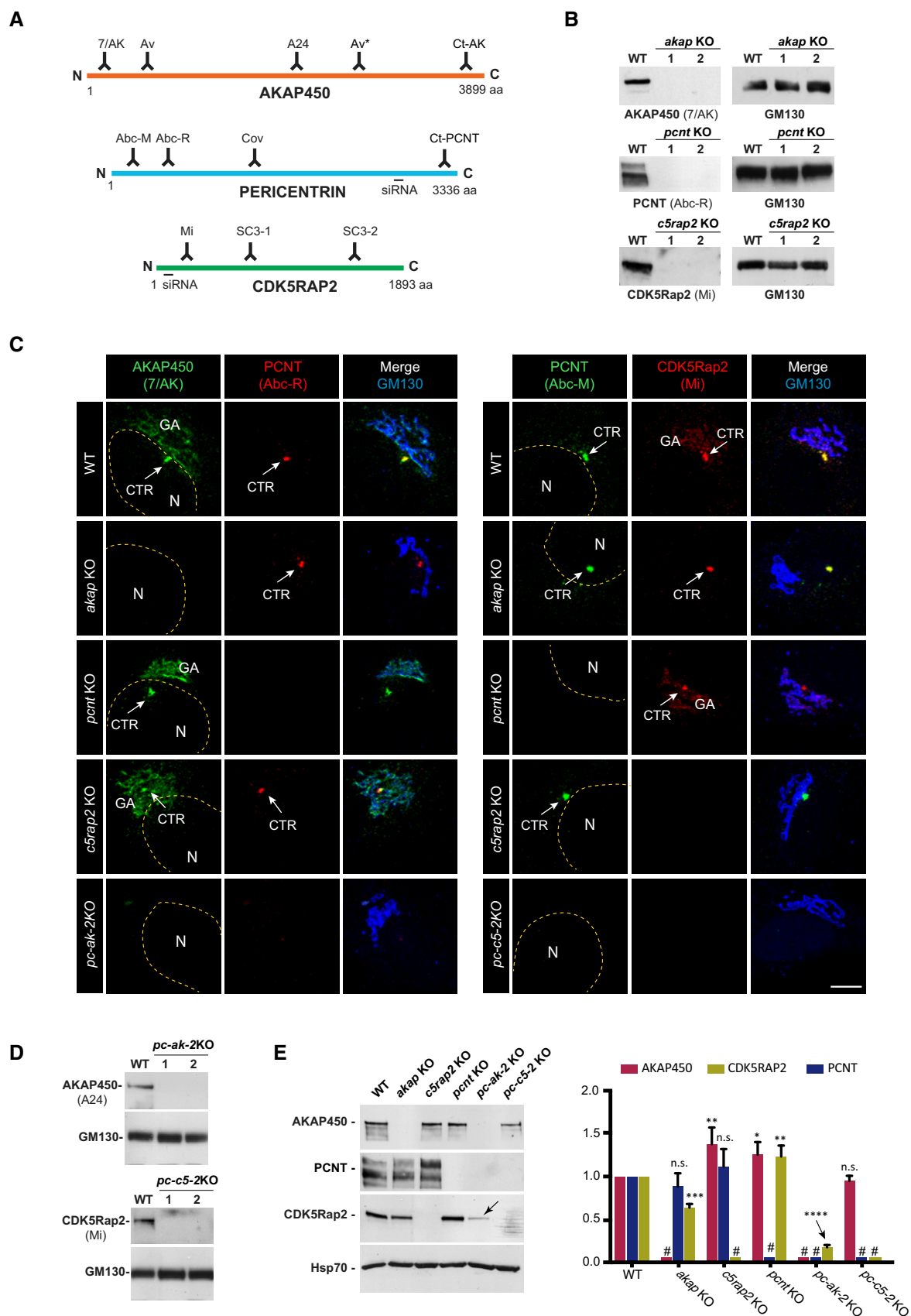


Figure 1.

Figure 1. Characterization of single and double knock-out cell lines.

- A Schematic representation of AKAP450, PCNT, and CDK5Rap2 proteins illustrating localization of the epitopes recognized by the antibodies and the sequences targeted by the siRNAs used in this study.
- B Representative WBs of RPE-1 wild-type (WT) cells and the two selected KO clones for AKAP450 (*akap* KO), PCNT (*pcnt* KO), and CDK5Rap2 (*c5rap2* KO) probed with the indicated antibodies.
- C Confocal IF images of RPE-1 WT, single KO (*akap* KO, *pcnt* KO, and *c5rap2* KO), and double KO (*pc-ak*-2KO, left panels; *pc-c5*-2KO, right panels) cells stained with the indicated antibodies. The yellow dashed line indicates the nucleus contour, (N) and the arrows point the centrosome (CTR). GA marks the Golgi apparatus. Scale bars: 5 μ m.
- D Representative WB of RPE-1 WT cells and the two selected PCNT/AKAP450 (*pc-ak*-2KO) and PCNT/CDK5Rap2 (*pc-c5*-2KO) double knock-out-mutated clones probed with the indicated antibodies.
- E Representative WB of RPE-1 WT cells and the indicated single or double KO cell lines probed with anti-AKAP450, PCNT, and CDK5Rap2 antibodies (left). Quantification of signal intensity from three independent WB experiments is shown at right. # indicates KO proteins. The arrow points the dramatic decrease in CDK5Rap2 levels in *pc-ak*-2KO cell line. Bars represent mean values \pm standard deviation (SD) of three independent experiments.

Data information: GM130 was used as a loading control in (B and D). Hsp70 was used as a loading control in (E). For statistical analysis, we used one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$; n.s., non-significant. Source data are available online for this figure.

modestly affected the amount of the other proteins (ranging from 90 to 125%: Fig 1E). However, *akap450* KO cells did contain significantly less CDK5Rap2 (60%), an effect that was enhanced dramatically by the further depletion of PCNT. Under these conditions, CDK5Rap2 was almost completely depleted, and thus, the stability of CDK5Rap2 might depend on its interaction with AKAP450 and/or PCNT.

The role of the three canonical γ -TuRC-binding factors in MT nucleation

To evaluate the effect of inhibiting GA-associated MT nucleation on centrosomal MTOC activity, we analyzed *akap450* KO cells. As expected from previous work [24], these cells did not nucleate MTs from the GA, but they still exhibited centrosomal asters in MT regrowth experiments after nocodazole (NZ)-induced MT depolymerization. The MTOC activity of the centrosome under these conditions was quantified through two complementary approaches. First, we scored EB1 comets surrounding the centrosome as a measure of newly nucleated MTs (Fig 2A and B). Second, we determined the MT density of the centrosomal aster after a short NZ washout (Fig 2C and D). Since MT dynamics is very sensitive to time and temperature conditions, we performed regrowth experiments in mixed populations of WT and KO cells. Only slight differences between WT- and AKAP450-depleted cells were detected using either of these methods (96 and 98%, respectively; Fig 2B and D) indicating that inhibition of GA-mediated MT nucleation does not significantly affect centrosomal MT nucleation activity. Thus, it appears that the centrosome functions as an autonomous MTOC. These data also reveal that AKAP450 is dispensable for MT nucleation at the centrosome.

To evaluate the contribution of the other canonical γ -TuRC-binding factors to centrosomal MT nucleation, we analyzed single *cdk5rap2* and *pcnt* KO cells, as well as the double PCNT/AKAP450- and PCNT/CDK5Rap2-depleted cell lines (Fig 2A–D). Cells lacking either CDK5Rap2 or PCNT exhibited almost normal MT nucleation from the centrosome (90 and 86%, and 88 and 85%, respectively; see Fig 2B and D). Even in dual *pcnt/akap450* KO cells, in which CDK5Rap2 was also strongly diminished (see Fig 1E), MT nucleation at the centrosome was only reduced by approximately 10% (90 and 94%, respectively; Fig 2B and D). Since myomegalin is

released from the centrosome in the absence of AKAP450 [19], we concluded from these results that MT nucleation at the centrosome is only modestly affected by the absence of all four canonical γ -TuRC-binding factors. This unexpected result prompted us to examine the contribution of another key γ -TuRC-recruiting factor to centrosomal MT nucleation, namely CEP192. We first tried to generate CRISPR/Cas9-mediated *cep192* KO cells. However, although we were able to identify cells lacking CEP192 labeling just after transfection, we failed to obtain *cep192* KO stable cell lines. Therefore, we decided to assess the role of CEP192 in MT nucleation by siRNA (Fig EV3). When the EB1 comets (Fig 2E) and MT regrowth after NZ removal (Fig 2G) were quantified in cells in which CEP192 was silenced, MT nucleation from the centrosome was reduced by 27 and 31%, respectively (Fig 2F and H). CEP192 depletion in double *pcnt/akap450* KO cells, that also lack CDK5Rap2, further reduced centrosomal MT nucleation with respect to the WT cells (a 41.2 and 59.3% decrease, respectively). These results revealed a significant role of CEP192 in centrosomal MT nucleation during interphase which, together with the canonical γ -TuRC-binding factors, is responsible for more than 50% of centrosomal MT nucleation.

Recovery from NZ treatment was also used to analyze the impact of genetic ablation of γ -TuRC-binding proteins on MT nucleation at the GA. Quantification of the EB1 signal associated with elements of the GA showed a moderate decrease in GA-associated MT nucleation (a 27% decrease) in *cdk5rap2* KO cells compared to WT cells (Fig 2I and J) consistent with earlier data [28]. Remarkably, while PCNT is only detected weakly at the GA in WT RPE-1 cells, we noticed a significant increase in GA-associated MT nucleation in cells lacking PCNT (143%; Fig 2J). The molecular basis for this result is explored further below, yet nevertheless, we conclude that MT nucleation at the GA is strictly dependent on AKAP450, whereas it is facilitated by CDK5Rap2 and negatively regulated by PCNT.

Together, these data demonstrate that canonical γ -TuRC-binding proteins control GA-associated MT nucleation, while they only contribute mildly to centrosomal MT nucleation, which is more dependent on CEP192 and on additional uncharacterized mechanisms. However, why the four canonical γ -TuRC-binding factors are recruited to the centrosome despite their minor contribution to centrosomal nucleation remains an important question.

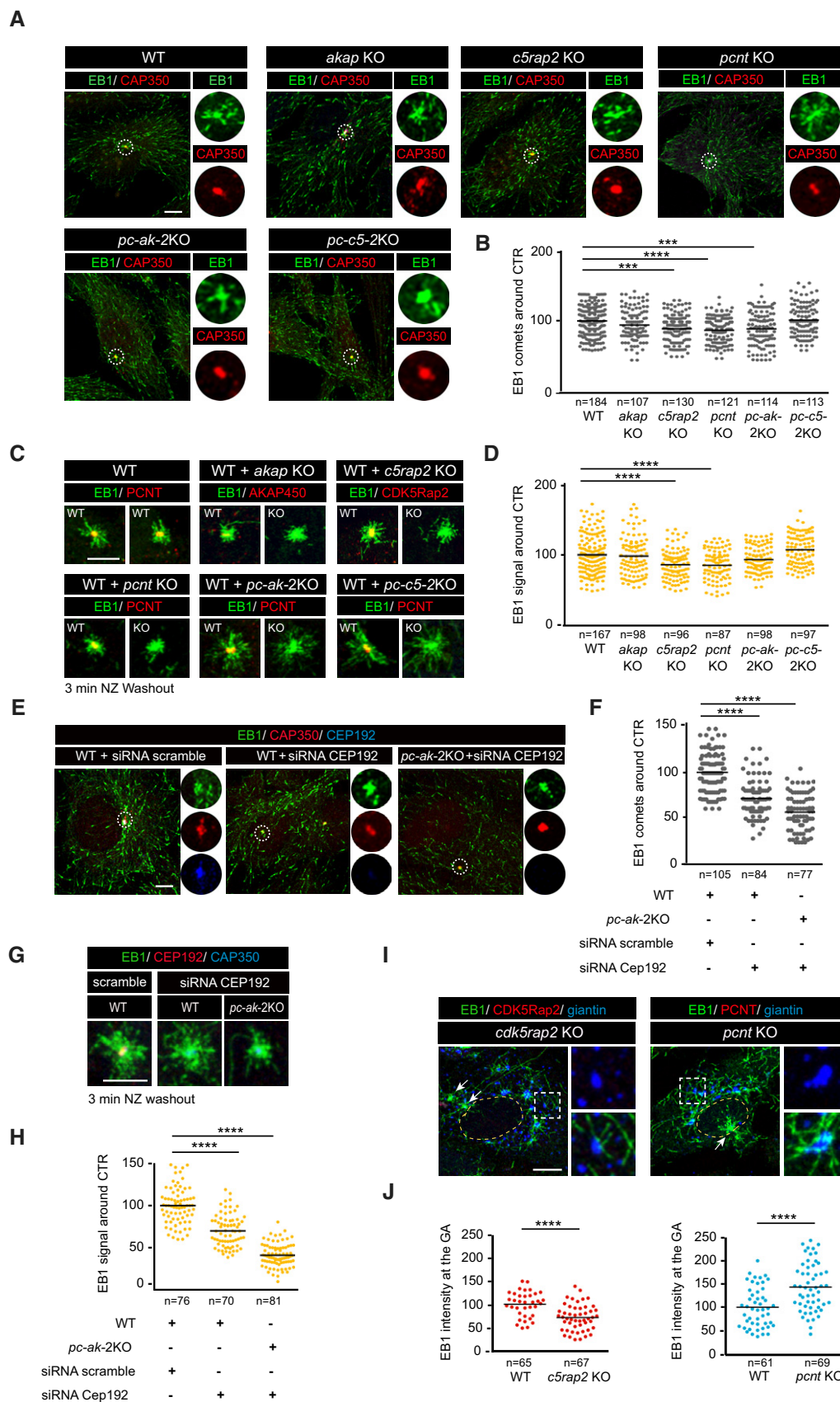


Figure 2.

Figure 2. Analysis of centrosome and GA MT nucleation.

- A Confocal images of WT, *akap* KO, *c5rap2* KO, *pcnt* KO, *pc-ak*-2KO, and *pc-c5*-2KO cells stained for EB1 (green) and the centrosomal protein CAP350 (red). High-magnification single-channel images of selected areas are shown at right.
- B Scatter plot showing quantification of EB1 comets from three independent experiments as that shown in (A). A region of interest of 3 μ m radius around the CAP350 signal was used to count the number of comets. Horizontal black lines represent the mean.
- C MT regrowth experiments of WT cells mixed with either WT (as a control), *akap* KO, *c5rap2* KO, *pcnt* KO, *pc-ak*-2KO, or *pc-c5*-2KO cells. Samples were fixed 3 min after NZ washout and stained for EB1 (green) and the indicated protein in the red channel.
- D Quantification of EB1 signal intensity around the centrosome from three experiments as that shown in (C).
- E WT and *pc-ak*-2KO cells were transfected with a combination of three siRNAs against CEP192, fixed, and triple-labeled for EB1, CEP192, and CAP350, as a centrosomal marker. Scramble siRNA was used as a control.
- F EB1 comets around the centrosome were quantified as in (A).
- G Three-minute MT regrowth experiments in WT and *pc-ak*-2KO cells transfected with either scramble or CEP192 siRNAs.
- H Quantification of the EB1 signal intensity around the centrosome as in (D).
- I MT regrowth experiments in WT and *c5rap2* KO or *pcnt* KO cells. Cells were stained as indicated. Arrows point the centrosome.
- J Quantification of EB1 signal intensity at Golgi membranes.

Data information: Data were collected from three independent experiments and normalized to WT mean. For statistical analysis in (A–H), we used one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, and for statistical analysis of (J), unpaired two-tailed Student's *t*-test was employed. ****P* < 0.001 and *****P* < 0.0001. Scale bars, 5 μ m.

Intracellular distribution of the different complexes containing γ -TuRC-binding factors

We further attempted to clarify the mutual interactions between the different γ -TuRC-binding factors at their different intracellular localizations. First, we immunoprecipitated endogenous proteins from the soluble fraction of WT cells, and we found that CDK5Rap2 and γ -tubulin co-immunoprecipitated when either AKAP450 or PCNT was pulled down (Fig 3A and B). However, unlike data reported in HeLa cells [17], we failed to co-immunoprecipitate AKAP450 with PCNT and *vice versa* (Fig 3B and data not shown). Hence, RPE1 cells contain at least two kinds of γ -TuRC-binding complexes, one formed by PCNT-CDK5Rap2- γ -tubulin and the other by AKAP450-CDK5Rap2- γ -tubulin (see schemes in Fig 3J).

We assessed the intracellular distribution of these complexes in either WT or KO cells by IF. Since the GA usually surrounds the centrosome in RPE-1 cells, centrosome- and GA-associated protein pools frequently overlap. To circumvent this problem, cells were treated with NZ to fragment the GA and disperse the Golgi elements throughout the cytoplasm prior to performing IF. Notably, AKAP450 depletion resulted in a 1.5-fold increase in PCNT at the centrosome (Fig 3C), and reciprocally, depletion of PCNT augmented AKAP450 to a similar extent (Fig 3D). Hence, AKAP450 and PCNT appear to target the centrosome independently, suggesting that they compete for centrosome binding, the absence of one favoring the accumulation of the other. Since both AKAP450 and PCNT share a common C-terminal centrosome-docking domain, the PACT domain, one possibility is that PCNT and AKAP450 compete for PACT domain-binding sites at the PCM.

CDK5Rap2 depletion did not affect either AKAP450 or PCNT binding to the centrosome, indicating that this protein lies downstream of the association of these proteins with the PCM (Fig 3E). Finally, the loss of PCNT greatly reduced (60%) CDK5Rap2 binding to the centrosome (Fig 3F), although this increased slightly in *akap450* KO cells. No CDK5Rap2 staining at the centrosome was observed in double *pcnt/akap450* KO cells. However, there was a dramatic reduction in the total CDK5Rap2 under these conditions (Fig 3F and see Fig 1E).

To assess the relative contributions of all these factors to the centrosomal localization of γ -tubulin, we quantified the γ -tubulin IF signal in the WT and mutant cell lines. Interestingly, the loss of

AKAP450 enhanced the binding of γ -tubulin to the centrosome by 21%, while the loss of PCNT reduced its binding by the same amount (Fig 3G). The loss of CDK5Rap2 did not affect centrosomal γ -tubulin levels (99%), and more strikingly, the centrosomal γ -tubulin in the two double KO cell lines was similar to that in the WT cells (104 and 95%, respectively; Fig 3G). These results indicate that depletion of the three main canonical γ -TuRCs from the interphase centrosome (AKAP450, PCNT, and CDK5Rap2) does not severely compromise γ -tubulin centrosomal recruitment, consistent with the absence of significant changes in centrosomal MT nucleation (see Fig 2). Conversely, considerable centrosomal γ -tubulin was redistributed after CEP192 depletion (38%; Fig 3H), which was more evident in CEP192-depleted double *pcnt/akap450* KO cells (54%; Fig 3H).

Finally, our data confirmed the distribution of these proteins at the GA reported previously [25] indicating that CDK5Rap2 is recruited to the GA through its interaction with AKAP450 (not shown). Punctate PCNT staining in the GA area did not co-localize precisely with Golgi markers in our experimental conditions (see Fig 5A). However, in agreement with the increase in GA-mediated MT nucleation described above (Fig 2), there was a modest increase in AKAP450 labeling at the Golgi membrane in *pcnt* KO cells (108%), in conjunction with a considerable increase in Golgi-associated CDK5Rap2 (144%; Fig 3I).

A cartoon summarizing the behavior of the different γ -TuRC-binding protein complexes studied here is presented in Fig 3J. Our results support the existence of at least two types of protein complexes: those containing AKAP450 and CDK5Rap2 (AKAP450-based complexes) that are present at both the GA and the centrosome; and those formed by PCNT and CDK5Rap2 (PCNT-based complexes) that specifically localize to the centrosome. When AKAP450 is depleted, we detected higher levels of PCNT at the centrosome that might account for the increase in centrosomal γ -tubulin observed. In the absence of PCNT, there is less γ -tubulin at the centrosome in conjunction with increased AKAP450. The loss of PCNT also stimulated CDK5Rap2 recruitment to the GA, which could explain the increment in GA-mediated MT nucleation.

The role of the centrosome in GA-mediated MT nucleation

While depleting canonical γ -TuRC-binding factors was successful to assess the impact of inactivating GA-mediated MT nucleation on

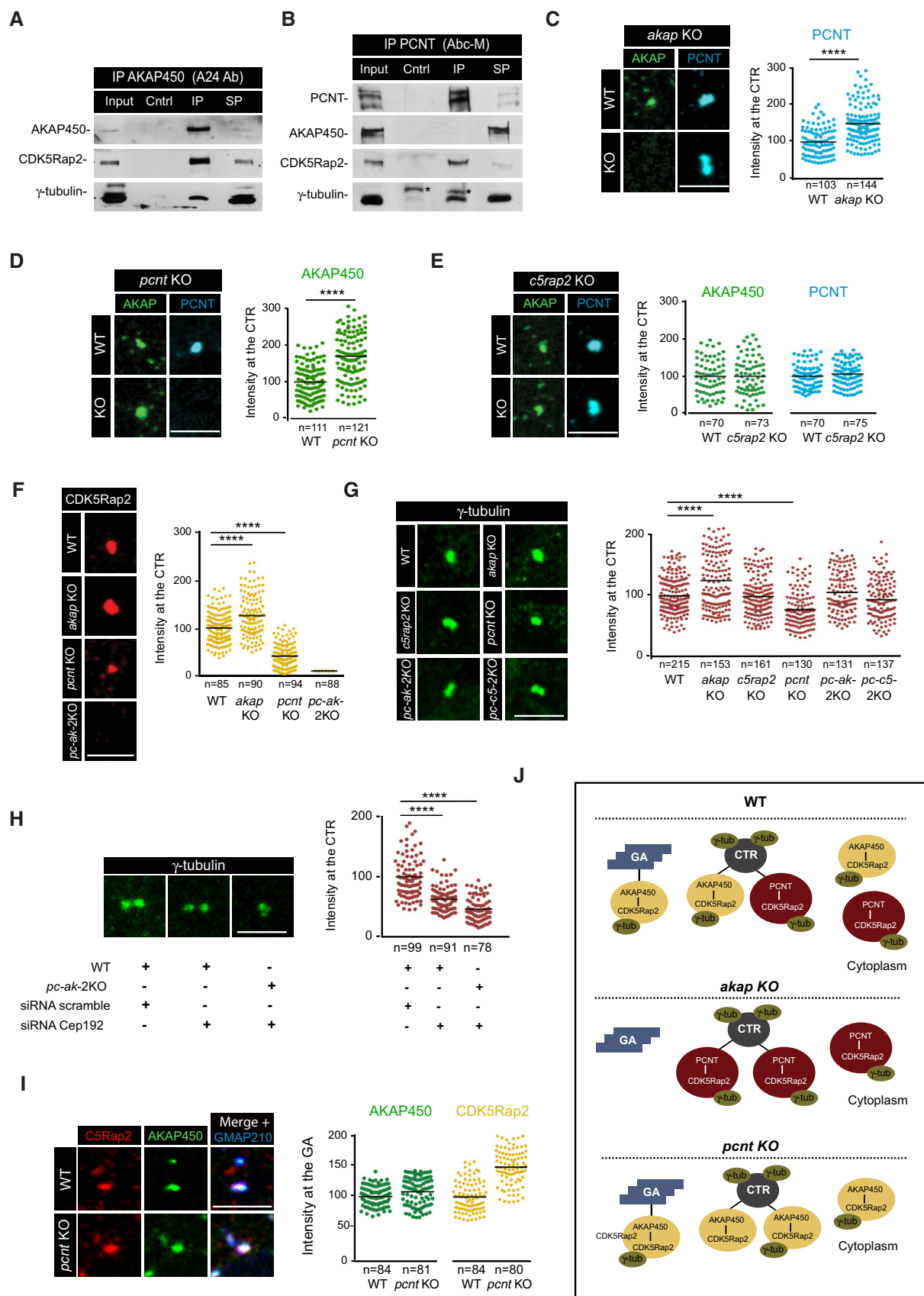


Figure 3.

Figure 3. Distribution of γ -TuRC-binding factors containing complexes.

- A, B WB of AKAP450 (A) and PCNT (B) co-immunoprecipitation assays revealed with the indicated antibodies. Asterisks mark immunoglobulin heavy chains. Cntrl, non-specific Igs immunoprecipitates; IP, specific Igs immunoprecipitates; SP, supernatant.
- C–G (Left) Centrosomes from WT, single, and double KO cells, as indicated, were labeled for AKAP450 and PCNT (C–E), CDK5Rap2 (F), and γ -tubulin (G). Right panels show quantifications. A region of interest of 1.5 μ m radius was drawn around the centrosome, and fluorescence intensity was determined and normalized to WT mean.
- H WT and *pc-ak*-2KO cells were transfected with either scramble or CEP192 siRNAs, fixed, and stained for γ -tubulin. Quantification of the fluorescence intensity is shown at right.
- I IF images of WT and *pcnt* KO RPE-1 cells treated with NZ for 3 h and triple-stained for AKAP450 (green), CDK5Rap2 (red), and GMAP210 as a Golgi marker (blue). At right, quantification of fluorescence co-localization of either AKAP450 or CDK5Rap2 with the Golgi marker GMAP210 in WT and *pcnt* KO cells.
- J Scheme summing up the changes in AKAP450-based and PCNT-based complexes distribution in WT, *akap* KO, and *pcnt* KO RPE-1 cells and their impact on γ -tubulin recruitment. GA, Golgi apparatus. CTR, centrosome.

Data information: Data were collected from three independent experiments except for (E and I), which are based on two independent experiments, and normalized to WT mean. For statistical analysis (C–H), we used one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, and for statistical analysis of (J), two-tailed Student's *t*-test was employed. *****P* < 0.0001. Scale bars, 5 μ m.

Source data are available online for this figure.

centrosome activity, we did not find experimental conditions that allowed us to block, or even significantly diminish, centrosomal MT nucleation without affecting GA MT nucleation. Therefore, we employed an alternative approach using the PLK4 inhibitor centrinone, which blocks centriole duplication and induces the loss of the centrosome [32]. This approach can also generate cells with extra centrosomes, as removal of the inhibitor triggers a wave of centrosome duplication [32].

When cells lacking the centrosome were subjected to MT regrowth for 3 min after NZ-induced MT disassembly, virtually all MTs grew as asters from scattered Golgi elements (Fig 4A). To assess the changes in MT-nucleating activity of the GA upon the loss of the centrosome, we used software that automatically identifies individual Golgi elements, as well as MTs growing from each of these elements (see cartoon in Fig 4B). Individual cells were defined before the analysis, and the centrosome of control cells was also identified and excluded from the analysis. Quantification of more than 50 control or centrinone-treated centrosome-less cells revealed that in the absence of centrosomes, there was a threefold increase in the number of GA-associated growing MTs per cell (42.7 MTs/control cell versus 118.6 MTs/centrinone-treated cell; Fig 4C). A detailed analysis revealed that the number of MTs nucleated from each Golgi element increased from 1.9 to 3.7 and that the number of nucleating Golgi elements per cell increased 1.3-fold in centrosome-less cells (24.3 versus 31.6; Fig 4C). To rule out that this were a direct effect of PLK4 inhibition on the MT-nucleating activity of the GA, we performed similar polymerization experiments in cells harboring a normal centrosome number but treated with centrinone for 3 or 12 h. Exposure to centrinone did not produce any differences relative to the control cells (Fig EV4A), confirming that the increase in the MT-nucleating activity of the GA in centrinone-treated cells was a consequence of centrosome loss.

We then performed similar experiments 48 h after removal of the drug, with centrinone washout resulting in transient hyper-activation of PLK4 that provokes the generation of multiple centrosomes [32]. Newly formed centrosomes actively recruited γ -tubulin and nucleated MTs (Fig 4D), whereas the capacity of the GA to bind γ -tubulin and to promote MT nucleation was markedly dampened in these conditions. To quantify this phenotype, we determined the percentage of cells containing two (control), none (centrinone-treated), six, or more than eight centrosomes (centrinone washout), in which MT nucleation at the GA was inhibited (Fig 4E). Centrosomes were identified by CEP63 staining. Fifty-seven percent of the

cells containing six centrosomes did not nucleate MTs from the GA. This inhibitory effect was even stronger in cells containing more than eight centrosomes (63%). Thus, the high number of MT-nucleating centrosomes under these conditions appears to dramatically reduce the capacity of Golgi membranes to efficiently assemble MTs.

In summary, the GA MT nucleation activity is not only dependent of the presence of a centrosome but also, it is affected by an extra number of centrosomes. Thus, the MT-nucleating capacity of the GA during interphase is sensitive to aberrant numbers of centrosomes, which might be relevant for a number of pathological disorders in which such conditions arise.

Recruitment of γ -TuRC-binding factors to the GA in the absence of the centrosome

To identify the factor(s) involved in the enhanced GA-mediated MT nucleation in the absence of the centrosome, we first examined the distribution of AKAP450, CDK5Rap2, and PCNT in centrinone-treated cells by IF (Fig 5A). Consistent with earlier data [32], the GA exhibited a normal morphology and location despite the absence of the centrosome (Fig 5A), and AKAP450 staining and CDK5Rap2 staining were also apparently unchanged. However, PCNT labeling was redistributed as numerous spots concentrating around the GA rather than it associating with the PCM as in control cells (Fig 5A). Importantly, we did not observe any accumulation of CEP192 at the GA in cells lacking centrosomes (Fig 5A), indicating that the association of PCNT with Golgi membranes in the absence of centrioles is not due to a general redistribution of the entire PCM to the GA but rather, that is a specific effect on a subset of proteins.

Closer examination and quantification after NZ-induced MT disassembly revealed that levels of Golgi-bound AKAP450 and CDK5Rap2 increased 1.5-fold in centrinone-treated cells (a 151 and 154% increase, respectively). The accumulation of PCNT at the GA in centrosome-less cells was more spectacular (> 8,000%: Fig 5B and C). MT regrowth experiments revealed that PCNT specifically localized to Golgi-associated MT nucleation foci, where AKAP450, CDK5Rap2, and γ -tubulin also accumulated (Fig 5D). These observations suggest that in the absence of the centrosome, all these proteins can form large protein complexes at the surface of *cis*-Golgi membranes.

We next wondered how PCNT, which does not visibly bind to Golgi membranes under normal conditions, associates with the GA

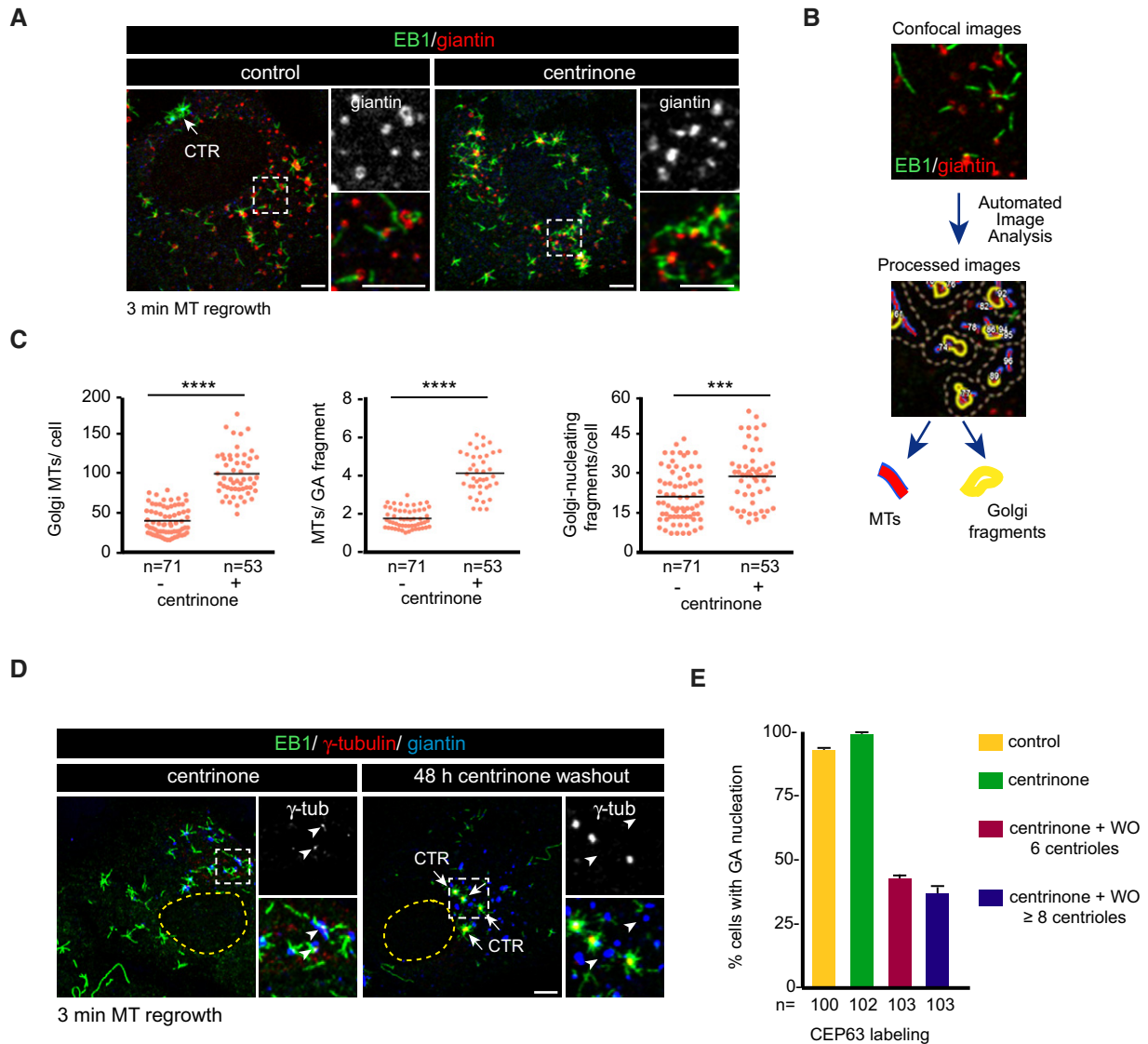


Figure 4. The centrosome regulates MT nucleation activity of the GA.

A Control and centrione-treated cells were subjected to a 3-min MT regrowth assay, fixed, and labeled for EB1 (green) and giantin (red). Insets show magnified images of boxed regions.

B Workflow of the method used for quantifying MT nucleation from the GA.

C Quantification of the total number of growing MTs per cell (left), the number of MTs nucleated per Golgi fragment (middle), and the number of MT-nucleating Golgi fragments (right) in both control and centrosome-less RPE-1 cells. Scatter plots show each individual data point. Horizontal black lines bars represent the mean.

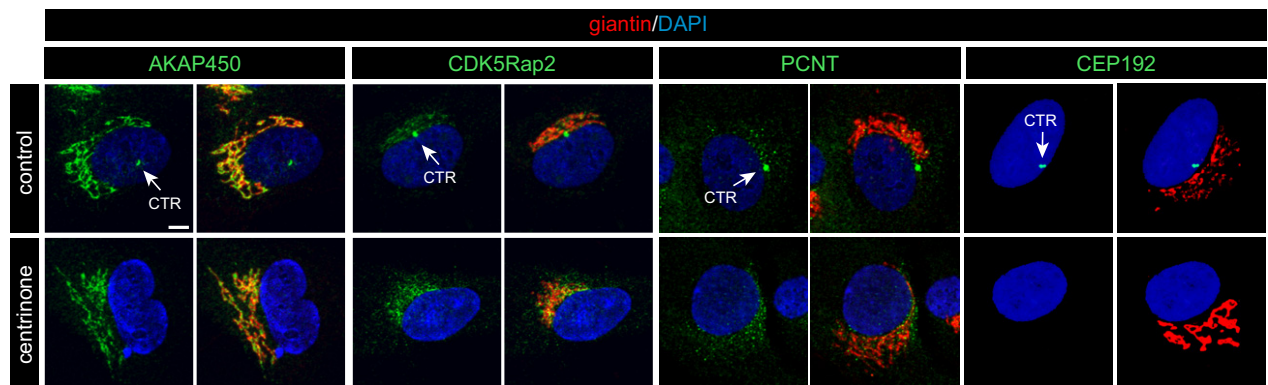
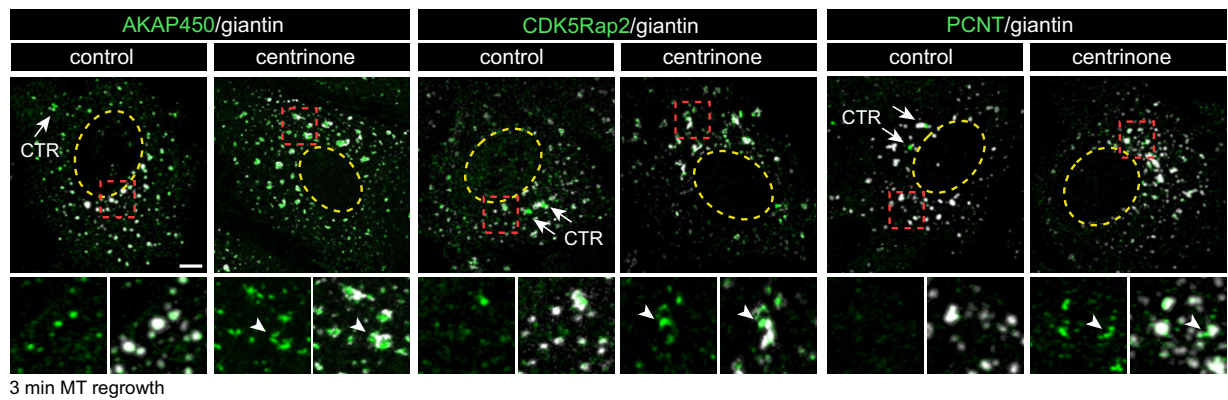
D RPE-1 cells were treated with centrione for either 7 days (left) or for 5 days and then allowed to recover for 48 h in the absence of the drug prior to fixation (right). Representative images of a triple IF staining with EB1 (green), γ -tubulin (red), and giantin (blue) as a Golgi marker are shown. Insets show MT nucleation from Golgi elements (left) or from multiple centrioles (right) and are enlarged at right. Arrowheads indicate the position of Golgi elements.

E Quantification of the percentage of cells exhibiting Golgi-nucleating activity in centrione-treated cells 48 h after the washout of the drug. Cells were divided into two categories depending on the number of centrioles that were visualized by labeling for the centriole protein Cep63. At least 100 cells from two independent experiments were analyzed in each condition. Bars represent mean values \pm SD.

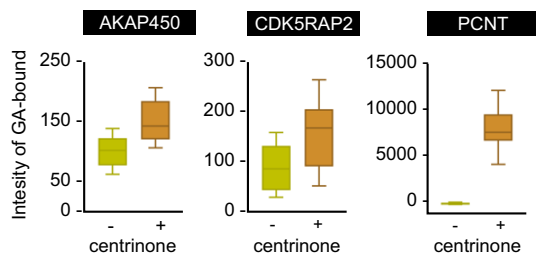
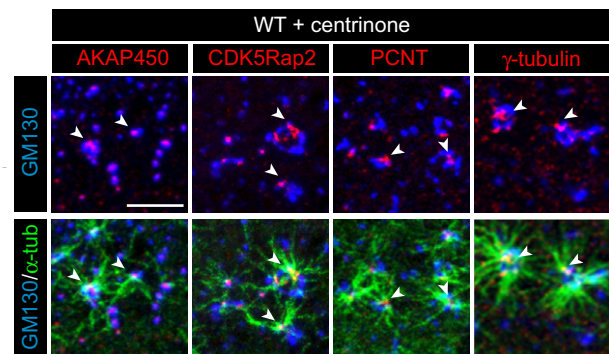
Data information: In (C), data were collected from three independent experiments and normalized to WT mean. For statistical analysis, we used unpaired two-tailed Student's *t*-test. ****P* < 0.001 and *****P* < 0.0001. Scale bars, 5 μ m.

in centrosome-less cells. We analyzed this question by assessing the distribution of these proteins in *pcnt*, *cdk5rap2*, or *akap450* KO cells treated with centrione. It must be noted that after 7 days in the presence of centrione, *cdk5rap2* and *pcnt* KO cell cultures contained very few cells without the centrosome, probably due to

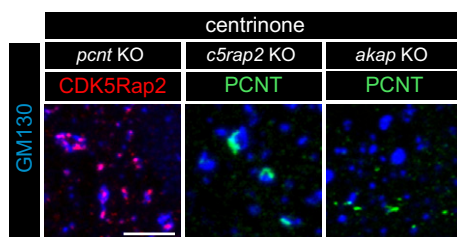
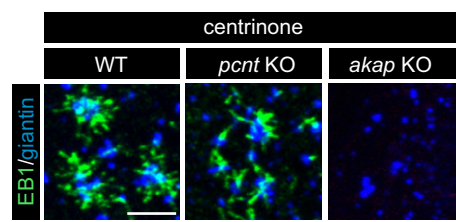
the role of these proteins in mitosis. Consequently, fewer cells could be analyzed in these experiments. The removal of PCNT did not alter the association of CDK5Rap2 with Golgi membranes in centrosome-less cells (Fig 5E). Likewise, PCNT also remained attached to the GA in the absence of CDK5Rap2 and centrosomes (Fig 5E).

A**B**

3 min MT regrowth

C**D**

3 min MT regrowth

E**F**

3 min MT regrowth

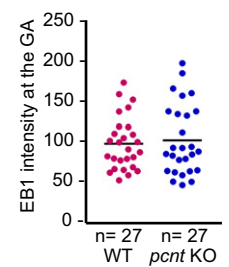


Figure 5.

Figure 5. Redistribution of γ -TuRC-binding factors to the GA in the absence of the centrosome.

- A Control (top) and centrinone-treated (bottom) RPE-1 cells double-stained for either AKAP450, CDK5Rap2, PCNT, or CEP192 (all shown in green) and giantin (red) as a Golgi marker. DNA was counterstained with DAPI and is shown in blue. Single-channel (left, green) and merged images (right) are shown in each case. White arrows indicate the centrosome (CTR).
- B IF images of control and centrinone-treated RPE-1 cells treated with NZ to induce GA fragmentation and double-stained with either anti-AKAP450, anti-CDK5Rap2, or anti-PCNT (all shown in green) and anti-giantin antibodies (white). Enlarged views of the boxed areas are presented at the bottom with or without the signal of the Golgi marker. The yellow dashed line indicates the contour of the nucleus. Arrowheads point to the accumulation of the respective proteins in Golgi membrane surfaces.
- C Box-and-whisker plots showing quantification of association between the indicated protein and Golgi elements (see Materials and Methods for details). Top and bottom ends of the boxes represent 75th and 25th percentiles, and whiskers represent 90th and 10th percentiles. The median is depicted with a solid line. Individual Golgi elements from at least 14 cells were delineated (> 500 elements/experiment), and the intensity of each protein spot associated with each Golgi element was measured. Data were collected from two independent experiments and normalized to WT mean.
- D MT regrowth experiment after NZ treatment in centrinone-treated cells. High-magnification images at the bottom are representative of a triple staining with α -tubulin (green), GM130 (blue), and the indicated protein (red) and show MTs growing from the surface of the GA. Double labeling without α -tubulin is also shown (top) to allow better visualization of PCM-protein spots on Golgi elements acting as MT nucleation sites (arrowheads).
- E Centrinone-treated *pcnt* KO, *c5rap2* KO, and *akap* KO cells were incubated with NZ for 3 h, fixed, and double-labeled for GM130 and either CDK5Rap2 or PCNT as indicated (*n* = 3).
- F MT regrowth assay in centrinone-treated WT, *pcnt* KO, and *akap* KO RPE-1 cells stained with antibodies to EB1 and giantin. At right, quantification of EB1 intensity at the Golgi membranes in WT and *pcnt* KO cells treated with centrinone, as a measure of MT nucleation from the GA. Data were collected from two independent experiments and normalized to WT mean.
- Data information: Scale bars, 5 μ m.

However, in the absence of AKAP450, both PCNT and CDK5Rap2 (Fig 1C) dissociated from the GA (Fig 5E). These results suggest that in cells lacking centrosomes, PCNT-based complexes redistribute from the PCM to the GA in an AKAP450-dependent manner. Finally, quantification of MTs growing from Golgi elements revealed no significant differences in centrosome-less *pcnt* KO cells compared to centrosome-less WT cells (Fig 5F), indicating that PCNT-based complexes did not significantly contribute to the enhanced MT-nucleating activity of the GA induced by centrosome loss. Conversely, and as expected, GA-associated MT nucleation was completely inhibited in centrosome-less cells lacking AKAP450 (Fig 5F).

MT formation in the absence of the centrosome and GA-associated MT nucleation

We then evaluated the impact of inhibiting MT nucleation at both the centrosome and the GA on MT cytoskeleton organization. We focused on centrinone-derived centrosome-less cells lacking AKAP450, cells that contained a cell-wide MT network even though both centrosome- and GA-associated MT nucleation were suppressed (Fig 6A). Hence, we wanted to determine whether this MT network was generated by spontaneous cytoplasmic MT polymerization or whether it was otherwise nucleated by previously unidentified MTOCs. Surprisingly, short-term MT polymerization experiments revealed MT asters distributed throughout the cytoplasm that did not co-localize with Golgi membranes (Fig 6B). Indeed, 3 h after NZ washout dense, non-radial and highly abnormal MT networks were evident (Fig EV4B).

To identify and characterize the structures responsible for MT nucleation under these conditions, we tested a panel of antibodies against PCM proteins, minus-end anchoring proteins, and centriole-associated proteins (listed in Fig 6C). As such, we found that these structures consistently contained PCNT, CDK5Rap2, and γ -tubulin, but they lacked CEP192 and, in the vast majority of cases, PCM1 (Fig 6D). The MT-anchoring protein CAP350 was also absent from these structures, while the presence of ninein depended on the size of the structure and it was only detected in some of the larger ones (Fig 6D). None of the centriole markers tested were evident in these

structures, such as centrin-2, CEP63, CP110 (Fig 6D), CEP135, CNAP-1, and centrin (Fig EV4C). Therefore, these cytoplasmic structures appear to be similar to centrosomal PCNT-based complexes, although they are fully capable of nucleating and anchoring MTs and thus of generating cell-wide arrays of MTs. Analyzing the dynamics of these structures after NZ washout (Fig EV4D) revealed no significant variation in either their number or size during MT polymerization. Thus, these cytoplasmic aggregates exist both in the absence of MTs and in fully assembled MT networks, indicating that they represent stable MT-nucleating complexes. Since they behave as true stable acentriolar cytoplasmic MTOCs, herein we will refer to these alternative cytoplasmic MT-nucleating structures as cMTOCs.

To identify factors required for the formation of the cMTOCs, we performed either CDK5Rap2 or PCNT siRNA experiments on *akap450* KO centrosome-less cells (Fig 6E). Once again, knocking-down CDK5Rap2 did not prevent either the formation of the cMTOCs or MT nucleation from them. By contrast, in the absence of PCNT, neither cMTOCs nor asters of growing MTs could be detected 3 min after NZ washout. We concluded that the absence of a centrosome and MT-nucleating activity associated with the GA does not preclude the formation of a MT cytoskeleton, which is generated by PCNT- and CDK5Rap2-containing cMTOCs.

Strikingly, depletion of PCNT in centrinone-treated *akap450* KO cells delayed but did not block MT formation (Fig 6E and F), yet scattered MTs were visible throughout the cytoplasm 10 min after NZ washout. This pattern of MT polymerization clearly differs from that of cells containing cMTOCs, in which MTs grew as asters (compare top and bottom panels in Fig 6F). However, in both cases, a disorganized meshwork of MTs completely filled the cytoplasm within 90 min (Fig 6F).

To gain further insight into these two modes of cytoplasmic MT generation, we performed short NZ washouts in cells lacking AKAP450 and the centrosome, in the presence or absence of PCNT (Fig 6G, as indicated). Furthermore, we treated the cells with the γ -tubulin inhibitor gatastatin that is thought to partially inhibit and delay MT nucleation [34,35]. Cells were treated with NZ, and after removal of the drug, they were incubated for an additional 10 min on

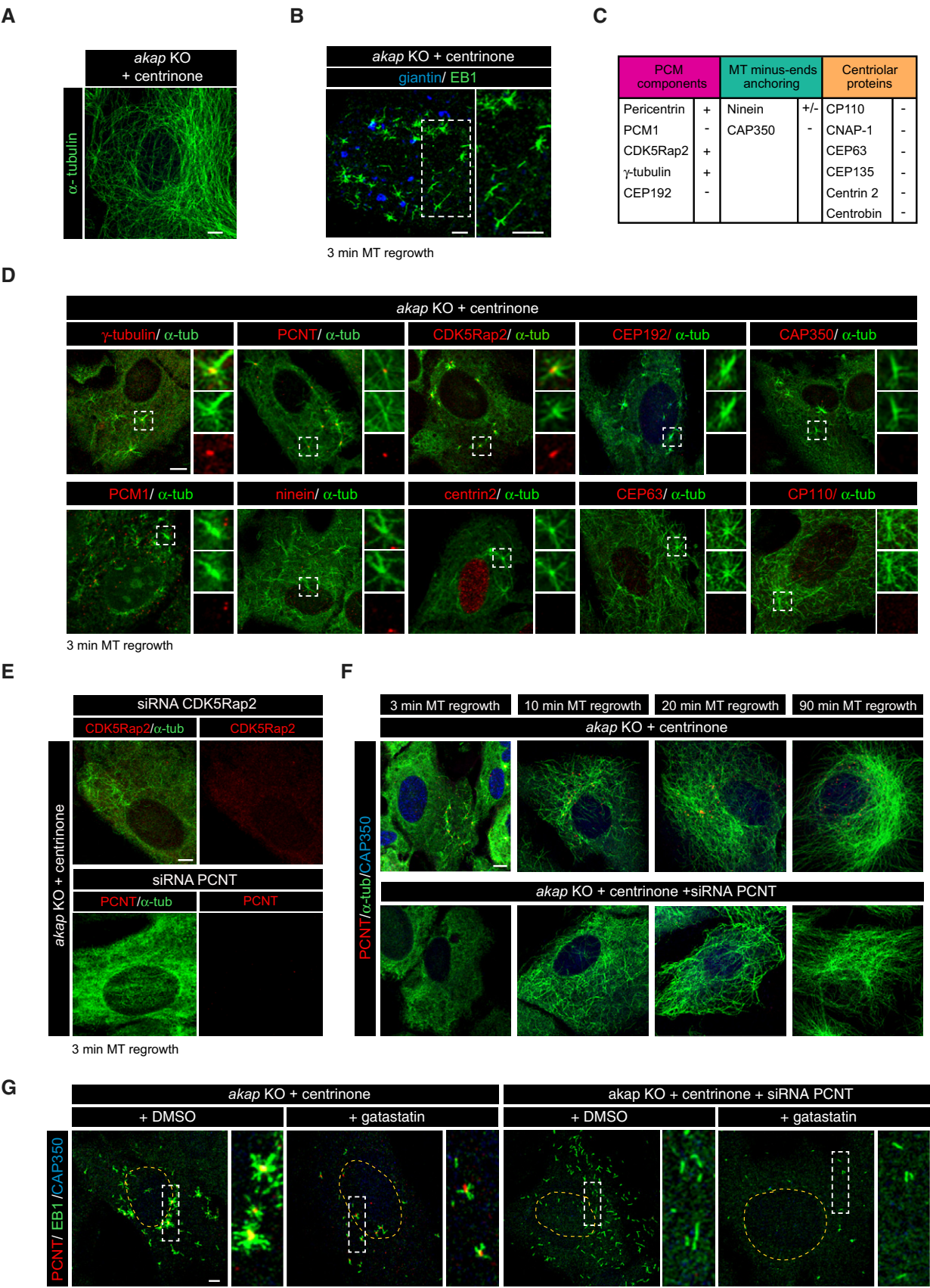


Figure 6.

Figure 6. Cytoplasmic MT nucleation in the absence of centrosome- and Golgi-mediated MT nucleation.

- A Representative MT network of a centrosome-less *akap* KO cell.
- B MT regrowth experiment after NZ treatment in centrinone-treated *akap* KO cells. A representative confocal image of a double labeling for EB1 (green) and giantin (blue) is shown. High magnification at right shows that growing MT asters are not associated with Golgi fragments.
- C Summary table of proteins present (+) or excluded (–) from MT-nucleating cytoplasmic structures.
- D Centrinone-treated *akap* KO cells were subjected to a MT regrowth assay and double-stained with the indicated antibodies. High-magnification images of the boxed areas are shown as merge (top) or individual green or red labeling (middle and bottom panels).
- E Cells lacking AKAP450 were treated with centrinone in order to induce the formation of cytoplasmic aggregates and then transfected with siRNAs specific for CDK5Rap2 (top panels) or PCNT (bottom panels). After 3-min MT regrowth, cells were fixed and stained with the indicated antibodies.
- F MT regrowth experiments in centrinone-treated *akap* KO cells transfected with either scramble or PCNT siRNAs. After a 3-h NZ treatment, MTs were allowed to polymerize and, at the indicated time points after washout, cells were fixed and labeled for α -tubulin (green), PCNT (red), and CAP350 (blue).
- G MT re-polymerization experiments in centrinone-treated *akap* KO cells transfected with either scramble or PCNT siRNAs. After NZ treatment and removal, cells were incubated for 10 min on ice and then warmed for 3 min in culture medium containing either DMSO or 30 μ M gatastatin. Cells were finally fixed and triple-stained with EB1 (green), PCNT (red), and CAP350 (blue) antibodies. Enlarged views of the boxed areas are presented at right.

Data information: Scale bars, 5 μ m.

ice before inducing MT regrowth by warming. We confirmed the complete disappearance of MTs by processing cells just before warming (Fig EV4E). Emerging MTs were identified by EB1 labeling. As expected, no MT asters were observed in the absence of PCNT, but rather, numerous short randomly located individual EB1 tracks were seen throughout the cytoplasm. MT generation was significantly reduced and delayed by gatastatin treatment (see amplified images in Fig 6G) in both the presence and absence of PCNT, suggesting that γ -tubulin is involved in both kinds of cytoplasmic MT nucleation.

Regulation of MT number by the centrosome

Finally, we wanted to quantitatively evaluate the effect of manipulating MT nucleation on the overall MT network organization. Thus, we labeled WT, single, and double KO cells, with or without the centrosome, for either α -tubulin or EB1 (Fig 7A and B). On the right of each panel, a cartoon represents the active MT nucleation sites under each condition tested; see also Fig EV5A). Individual cells were defined, and the MT mass polymer and total EB1 comets were quantified (Fig 7C–F). The MT mass was estimated by quantifying the total α -tubulin fluorescence in individual cells under each condition, normalizing the data to the mean signal of WT α -tubulin (Fig 7C). As an independent method to quantify MT number, we determined the number of EB1 comets per cell under all conditions (Fig 7D). In accordance with previous reports [28], we noted that cells without the centrosome appeared larger than control cells (Fig EV5B) with a 30% increase in cell volume (Fig EV5C). As this caused cells without centrosomes to preferentially adhere to larger adhesive micropatterns than control cells (Fig EV5B), we also determined cell area (Fig 7E) and calculated the MT density under each condition by referring the total MT mass-to-cell surface ratio (Fig 7F).

Depletion of AKAP450, CDK5Rap2, or PCNT, and dual depletion of PCNT-AKAP450 or PCNT-CDK5Rap2, led to minor or virtually no reductions in cell area (a 15, 10, 12, 5, and 2% decrease, respectively; Fig 7E). Conversely, the loss of centrosomes resulted in a threefold increase in the surface occupied (275.9%) with respect to untreated WT cells. This increase was significantly higher than that in cell volume determined by FACS analysis of centrosome-less RPE-1 cells, suggesting that adhesion to the substrate is altered in centrosome-less cells. Indeed, we observed a similar increase in cell surface in CDK5Rap2-depleted cells (248%) and this was even more pronounced in PCNT-depleted cells (299.8%) in the absence of the

centrosome. Centrosome-less *akap450* KO cells were also larger than *akap450* KO cells containing a centrosome, albeit less strongly (142%). Unfortunately, it was not possible to deplete double knock-out cells of their centrosomes. Finally, cells bearing extra centrosomes also increased their size (163.3%). Although additional work is required to further characterize this effect, these results strongly suggest that the number of centrosomes influences cell adhesion.

We also observed changes in MT polymer mass, with AKAP450- and PCNT-depleted cells containing 18 or 9% less MTs than WT cells, respectively. Interestingly, changes in MT polymer mass for these mutants essentially matched those of cell area (Fig 7C and E). Since KO cells are smaller than WT cells, they ultimately had a similar MT density to WT cells (96.6 and 104%, respectively; Fig 7F). A more pronounced effect on MT density was observed upon CDK5Rap2 removal (20.9% decrease), possibly due to its proposed effect on MT stabilization (Fig 7C and F). Strikingly, the dual *pcnt/akap450* and *pcnt/cdk5rap2* KO cell lines also exhibited modest changes in cell area or MT polymer mass, resulting in almost normal MT density values (117 and 107%, respectively). Note that the changes in EB1 comet number were essentially identical to those in MT polymer mass (compare Fig 7C and D).

Nevertheless, these differences were almost negligible when compared with the effect of centrosome loss on the MT network. Indeed, in the absence of the centrosome, MT polymer mass increased fivefold (550%) and the MT density doubled (199.5%; Fig 7C and F). Centrosome-less *akap450* KO and *cdk5rap2* KO cells also contained a larger MT mass than the corresponding KO cells with centrosomes (294.1 and 392.8%, respectively; Fig 7C), which translates to a higher MT density in both cases (207 and 167.6%, respectively). The only exception was for centrinone-treated *pcnt* KO cells that had a similar MT density to untreated cells (111%) suggesting that PCNT could be instrumental in connecting centrosome loss to MT density. Finally, the number of EB1 comets augmented more than threefold in the absence of centrosomes in both WT and single KO cell lines (Figs 7D and EV5D).

To test the possibility that the increase in MT density in centrosome-free cells was due to an increase in global tubulin content, we quantified the α - and β -tubulin in WBs of control and centrinone-treated cells. There were no substantial differences in either tubulin isoform when normalized to either the Hsp70 or total protein content (Fig EV5E and F), suggesting that the absence of centrosome significantly alters the dimer-polymer equilibrium.

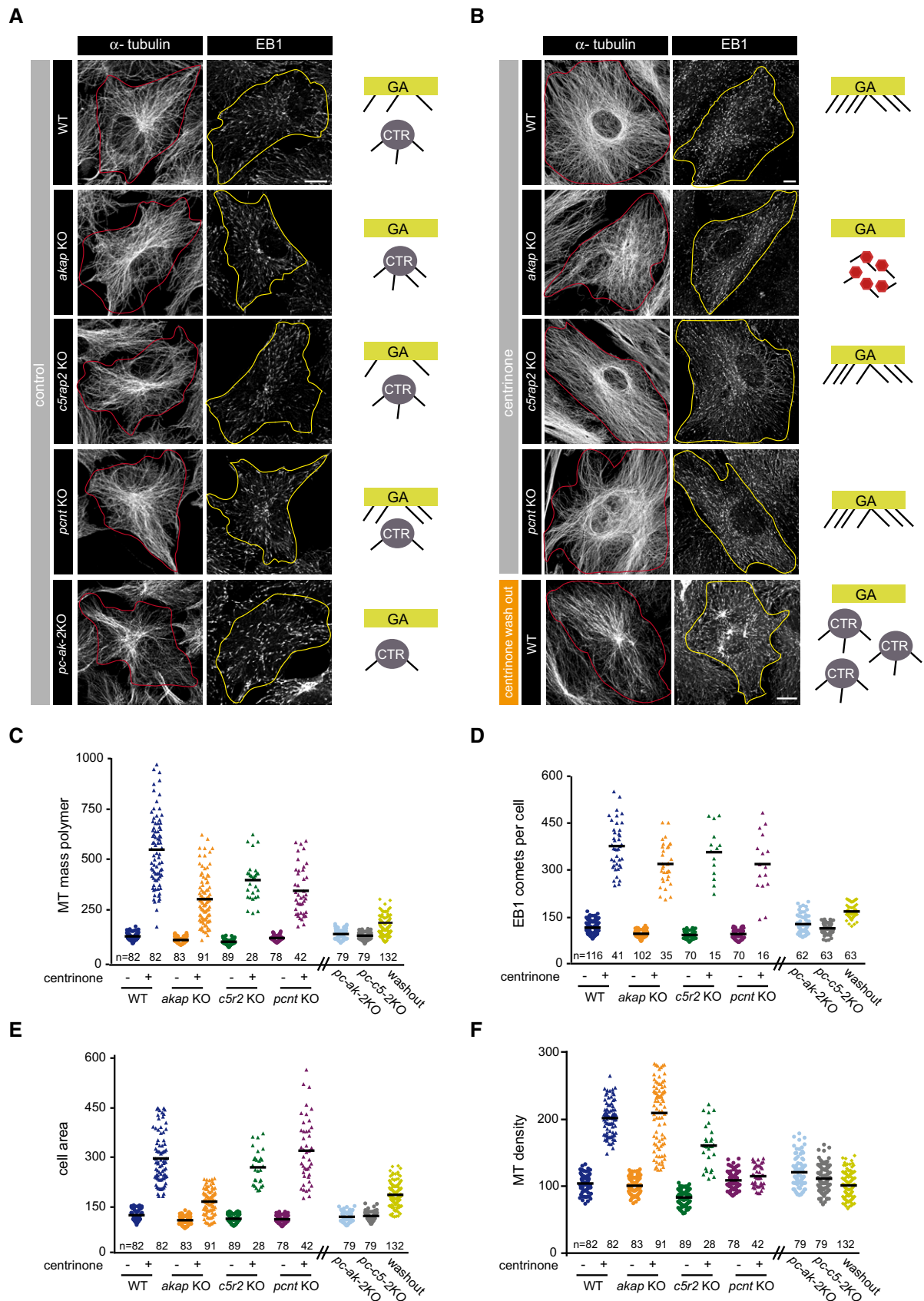


Figure 7.

Figure 7. The centrosome limits cytoskeleton MT density.

- A Confocal images showing MT network in WT, *akap* KO, *c5rap2* KO, *pcnt* KO, and *pc-ak-2*KO RPE-1 cells fixed and stained with antibodies against α -tubulin (left) or EB1 (right). The red and yellow lines indicate the contour of cells. A schematic representation of active MTOCs is shown in each case. GA, Golgi apparatus; CTR, centrosome.
- B Same as in (A), but in centrinone-treated WT, *akap* KO, *c5rap2* KO, and *pcnt* KO backgrounds. Cells containing extra centrosomes induced by centrinone washout were also quantified (bottom panels).
- C–F Quantification of α -tubulin fluorescence intensity (as a measure of MT mass polymer; C), number of EB1 comets per cell; (D), cell area; and (E), MT density (MT mass polymer/cell area; F) in control and centrinone-treated WT, *akap* KO, *c5rap2* KO, and *pcnt* KO cells. Non-centrinone-treated double KO cells and centrinone-treated WT cells after washout were also included. Scatter plots show each individual data point, and horizontal black lines bars represent the mean.
- Data information: Scale bars, 10 μ m. Data were collected from three independent experiments and normalized to the untreated WT control. Statistical analysis is shown in Fig EV5D.

Together, these results suggest that the centrosome controls the number of MTs per cell, irrespective of where they grow from, that is, from the GA in centrinone-treated cells or from cMTOCs in *akap450* KO cells treated with this drug. They also support the notion that the centrosome contributes to the generation of a less dense MT network by restricting global MT nucleation. To confirm this hypothesis, we quantified the same parameters in cells containing a large number of centrosomes induced by washing-out centrinone. Cells with extra centrosomes had 1.5-fold more MT mass (159.4%) and EB1 comets (153.3%) than control cells. However, since their cell area increased by the same proportion, their MT density was similar to that of control cells (97%: Fig 7C–F). We speculate that the presence of extra centrosomes could not only dampen GA-based MT nucleation (see Fig 4) but also MT nucleation from each individual centrosome in order to control the MT cytoskeleton.

Discussion

This work aimed to clarify the functional links between the two major MTOCs in interphase mammalian cells, producing novel and rather unexpected results. Firstly, centrosomes from cells lacking the three PCNT, CDK5Rap2, and AKAP450 proteins can still nucleate MTs. The inhibition of MT nucleation at the GA through AKAP450 depletion does not alter centrosome activity. However, eliminating the centrosome stimulates AKAP450-dependent MT nucleation at the GA, whereas the existence of a larger number of centrosomes prevents such activity. Moreover, switching off MT nucleation at the GA in cells lacking centrosomes induces the formation of cytoplasmic complexes containing PCNT, CDK5Rap2, and γ -tubulin, which acquire MT-nucleating activity. Further depletion of PCNT under these conditions promotes the generation of individual MTs throughout the cytoplasm and both kinds of cytoplasmic MT nucleation involve γ -tubulin. Finally, regardless of where MTs are being nucleated from, centrosome-less cells display a denser MT network than normal, although their α/β -tubulin content is not modified.

The mechanisms behind the apparent hierarchy of MTOCs

The data presented here reveal substantial differences between the role of canonical γ -TuRC-binding factors at the centrosome and the GA. The PCNT, AKAP450, or CDK5Rap2 proteins were not required for MT nucleation at the centrosome, and strikingly, centrosomes lacking the three proteins, and probably myomegalin [19], still nucleated MTs almost normally. Conversely, MT nucleation at the

GA was perturbed under all conditions, the effects ranging from complete inhibition in AKAP450-depleted cells to moderate stimulation in cells lacking PCNT. Thus, MT-generating activity at the GA during interphase depends on canonical γ -TuRC-binding proteins, unlike centrosomal nucleation. Our data show that CEP192 plays an important role at the centrosome, both under normal conditions and in the absence of the canonical γ -TuRC-binding proteins. Notably, the centrosome retained half of its MT-nucleating capacity even under these latter conditions, suggesting that additional mechanisms are likely to operate at the centrosome. Indeed, MT nucleation can be promoted independently of γ -tubulin by proteins such as chTOG and TPX2 [36].

Our results are consistent with studies in different organisms, where PCNT either does not participate in MT nucleation during interphase [37,38] or it may even inhibit MT nucleation at the centrosome [39] and GA [20]. Moreover, in cells lacking CDK5Rap2, we did not detect any defects in γ -TuRC recruitment or MT nucleation at the centrosome, in clear contrast to published data [13,18,21]. A more extensive analysis will be necessary to define the true contribution of these γ -TuRC-binding proteins to centrosomal function during interphase. Although far from well understood at the mechanistic level, our results suggest that PCNT is possibly an important regulator of the influence exerted by the centrosome over the GA. Indeed, the capacity of the GA to nucleate MTs was stimulated by either PCNT depletion or centrosome loss, although to a different extent. PCNT depletion also prevented the increase in MT density induced by centrosome loss. It is possible that PCNT enables the centrosome to somehow sense MT nucleation at other sites due to its capacity to act as a signaling platform [40].

Alternative cytoplasmic-nucleating sites

It is notable that when both the centrosome and AKAP450 were lacking, MT nucleation occurs from cytoplasmic MTOCs. These cMTOCs were able to organize a cell-wide MT network, suggesting that they contain all the activities required for the successful formation of MTs. However, of all the centrosomal markers tested, we only detected PCNT, CDK5Rap2, γ -tubulin, and sporadically, ninein, which could interact with γ -tubulin-containing complexes or with PCNT [41,42]. Remarkably, PCNT depletion completely inhibited the formation of cMTOCs, indicating a key role for this protein in the genesis of these structures. We speculate that the activity of PCNT as a scaffold protein for the assembly of the PCM reported previously [7] might also affect the formation of these cMTOCs. It should be noted that cMTOC activity is not generally observed in control cells, despite the abundant cytoplasmic pools of PCNT,

CDK5Rap2, and γ -tubulin. Conceivably, the recruitment of PCNT or CDK5Rap2 to the GA that is observed in centrosome-less cells containing an active GA-MTOC could correspond to complexes formed from the cytosolic pool of these proteins upon the suppression of the centrosome, and these complexes may be further sequestered by the GA.

Cytoplasmic MT nucleation foci were detected in early blastomeres of mouse embryos which lack centrioles and in *Drosophila* embryonic mitoses after centrosome inactivation [43,44]. In addition, acentriolar cytoplasmic MT-nucleating structures have been observed in centrosome-less human cells depleted of the ubiquitin ligase, TRIM37 [45], or in cells depleted of AKAP450 and CAMSAP2 that lack centrosomes [28]. However, these acentriolar entities clearly differ in both composition and structure from the cMTOCs reported here (see also Refs 46,47). In any case, these observations do reveal the ability of PCM proteins to assemble into different kinds of MT-nucleating complexes when the centrosome is absent. The possibility that GA-associated MT nucleation might also be down-regulated physiologically, leading to the formation of cytoplasmic MTOCs, is so far mere speculation. Theoretically, however, these cMTOCs could confer plasticity to the MT nucleation process, and thus, they might facilitate the organization of complex MT arrays in terminally differentiated cells.

Microtubule nucleation at the GA fully relies on complexes containing AKAP450, while that at cMTOCs requires PCNT. One may wonder why complexes containing PCNT and AKAP450 concentrate at the centrosome during interphase in control cells if their contribution to MT nucleation is negligible. Perhaps, the centrosome controls the organization of the cell's MT network in two ways: (i) by recruiting MT-nucleating activities, such as CEP192; and (ii) by sequestering factors necessary for MT assembly elsewhere, such as regulatory components of PCNT complexes for cytoplasmic assembly or of AKAP450 complexes for GA-associated MT nucleation. In this way, the centrosome could control the number of MTs within the cell by suppressing or dampening spontaneous assembly in the cytoplasm or assembly at the GA. In support of this hypothesis, centriole-mediated suppression of MT nucleation in the cytosol was predicted from observations on mitosis in early *Caenorhabditis elegans* blastomeres [48]. The notion that inhibiting one MT-generating pathway can be compensated by stimulating the activity of another was initially proposed on the basis of the mechanisms that contribute to spindle formation in *Drosophila* embryo mitosis [44]. However, our data suggest that different MTOCs do not occupy equivalent positions in the regulatory cascade, at least during interphase, and they situate the GA under the control of the centrosome. The dominant role of the centrosome in human cells also agrees with previous observations from cell fusion experiments of mitotic and differentiated intestinal cells performed in *C. elegans* embryos [49].

Notably, when all MT nucleation is apparently inhibited (i.e., in cells lacking the centrosome, AKAP450, and PCNT), numerous individual MTs still form throughout the cytoplasm that eventually organizes a MT network. MT generation was significantly delayed by gatastatin in this assay, indicating that γ -tubulin is involved in this kind of cytoplasmic MT nucleation. Individual MT cytoplasmic nucleation from single γ -TuRCs has been identified as the main mechanism of endoplasmic MT generation in protonemal cells of *Physcomitrella patens* [50]. We show here that the mammalian cytoplasm also possesses this capacity, although whether it is employed

in a physiological context is an exciting question that deserves further study.

A novel view on how the centrosome organizes the MT network at interphase

The global MT network configuration in individual cells is defined by the number of MTs and how these MTs are organized. Here, we provide evidence that the centrosome is not only able to control the distribution of cellular MT-nucleating activity and hence MT organization, but also, it helps maintain the steady-state number of MTs.

We found that in the absence of a centrosome, both in WT cells in which the GA becomes the only MTOC, or in *akap450* KO cells in which MTs are nucleated from cMTOCs, the MT density was double that of control cells. In other words, centrosome loss increased the MT number, indicating that centrosomal control of MT number is achieved by down-regulating the MT nucleation capacity of alternative MTOCs. Remarkably, this increase in MT density was prevented by PCNT but not by CDK5Rap2, suggesting a specific role of PCNT in the global regulation of MT nucleation. Overall, our data highlight a new role of the centrosome, namely that of restricting the total amount of assembled tubulin in cells.

It is also important to emphasize that global MT density was not significantly reduced when GA MT nucleation was inhibited, as occurs in AKAP450-depleted cells. Likewise, cells bearing extra centrosomes only slightly increased the number of MTs. Thus, MT number is apparently a robust feature of cells, suggesting that they have the ability to respond to significant modifications in the MT nucleation activity of their MTOCs. The centrosome is the key factor for this exquisite control of MT number, since it is completely lost in the absence of a centrosome. Although pure speculation, one might imagine that inactivation of the centrosome during cell differentiation could release its control over MT number, allowing differentiated cells to create a denser MT network. Indeed, more MTs are detected both in young myotubes [51] and in pancreatic β -cells where they regulate insulin secretion [12].

MT network changes during cell differentiation

Although there are diverse mechanisms underlying MT reorganization during cell differentiation, dampening the MT-nucleating activity of the centrosome, or even centrosome elimination, is a quite common strategy [9]. In neurons, muscle, or pancreatic cells, MT formation is ensured by Golgi membranes [10–12]. Inactivation of the centrosome is usually accompanied by shedding PCM components such as γ -tubulin, PCNT, CDK5Rap2, or AKAP450. Interestingly, these proteins are associated with Golgi membranes in both differentiated cells [11,52] and in centrinone-induced centrosome-less cells (see herein). Again, in both cases, MT nucleation was driven by AKAP450, whereas CDK5Rap2 and, especially, PCNT, had no significant influence [52]. These results suggest that centrinone-treated cells mimic the behavior of naturally occurring centrosome-inactivated differentiated cells. Why centrosome activity must be modified during cell differentiation is another issue. In any case, the constitutive plasticity of MT network organization demonstrated here, both in terms of MT number and sites of nucleation, would permit reorganization when necessary during differentiation.

In summary, this study provides us with an unexpected view of the interphase centrosome in human cells and of how plasticity in the control of the interphase MT network is ensured. In addition to its known role as a MT nucleator, the centrosome also controls MT network organization by dampening MT nucleation at the GA and suppressing it in the cytoplasm, thereby limiting MT formation and acting as a sensor of the overall MT network.

Materials and Methods

Cell culture, antibodies, and treatments

Immortalized human pigment epithelial cells hTERT-RPE1 (ATCC) were grown in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS at 37°C in 5% CO₂. hTERT-RPE1 FRT/TO cells were provided by J Pines (Gurdon Institute, Cambridge, UK).

hTERT-RPE1 cells were treated with 125 nM centrinone (kindly provided by K Oegema and A Siau, Ludwig Institute for Cancer Research, La Jolla, CA), for 4–7 days to induce centrosome depletion as previously described [32]. For washout experiments, we treated the cells with centrinone for either 5 days (Fig 4) or 12 h (Fig 7), and after washout of the drug, cells were maintained for 48 h prior to analysis. Gatastatin was a gift from T. Usui (University of Tsukuba, Japan) and I. Hayakawa (Okayama University, Japan).

For CYTOOchips experiments, control and centrinone-treated cells were seeded on Starter's CYTOOchips (CYTOO SA, Grenoble, France) following the manufacturer's protocol. Briefly, trypsinized cells were diluted to a concentration of 12,500 cells/ml, 50,000 cells dispensed into each micropattern and allowed to sediment for 10 min under the hood before moving them to the incubator. After 45 min, the medium was changed, the coverslip surface was gently flushed, and finally, cells were allowed to spread for 5 h before fixation.

SC3-1 and SC3-2 anti-CDK5Rap2 rabbit polyclonal antibodies were generated by Biomedal S.L. (Seville, Spain). To this purpose, constructs containing amino acids 650–900 or 1,400–1,600 of human CDK5Rap2 were inserted into the expression vector pMAB36-6xHis-LYTAG, and the resulting fusion proteins were purified by using the C-LYTAG fusion protein purification system.

Rabbit polyclonal anti-AKAP450 (A24), human sera against GMAP210, and mouse monoclonal anti-CAP350 have been previously described [24,53]. Rabbit polyclonal anti-PCM1 was from Bethyl laboratories (A301-149A-T). Monoclonal anti- α -tubulin (clone DM1A; T6199), anti- γ -tubulin (clone GTU88; T6557), and rabbit polyclonal anti-centrobin (HPA023321) were from Sigma-Aldrich; mouse monoclonal anti-centrin-2 (clone 20H5; 04-1624), rabbit polyclonal anti-CEP63 (06-1292), and rabbit polyclonal anti-CDK5Rap2 (Mi; 06-1398) were from Millipore. Mouse monoclonal anti-EB1 (clone 5/EB1; 610534) and anti-AKAP450 (7/AK; clone 7/AKAP450; 611518) were from BD Biosciences. Mouse monoclonal anti-CNAP-1 (clone F-7, sc-390540) was from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit polyclonal anti-GFP (RGFP-45A-Z) was from ICL, rabbit polyclonal anti-CP110 (12780-1-AP) was from Proteintech Group, and rabbit polyclonal anti-AKAP9 (Av; ARP39871_P050) was from Aviva Systems Biology. Rabbit polyclonal anti-CEP135 (ab75005), mouse monoclonal anti-Hsp70 (clone BRM-22, ab6535), mouse monoclonal (Abc-M; mAbcam 28144), and rabbit polyclonal anti-PCNT (Abc-R;

ab4448) were from Abcam. Goat polyclonal anti-AKAP450 (Ct-AK; MBS420313) was from MYBiosource.com, and rabbit polyclonal antibodies to pericentrin were from Biomatik (Ct-PCNT; CAU23943) and Covance (Cov; PRB-432C). Human anti- α -tubulin (F2C-hFc2; A-R-H#02), anti- β -tubulin (S11BhFc1; A-R-H#23), and anti-giantin (TA10 hFc2; A-R-H#03) were from the recombinant antibody platform of the Institut Curie. Rabbit anti-CEP192, anti-GM130, and goat anti-CAP350 were generous gifts from L. Pelletier (Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Toronto, Canada), Y. Misumi (Fukuoka University, Japan), and E. Nigg (Biozentrum, University of Basel, Switzerland), respectively. All secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch.

Constructions, transfections, and RNA interference

The sequences of the siRNAs used were as follows: PCNTB-1: 5' AAAAGCTCTGATTTATCAAAAGAAG; PCNTB-2: 5' TGATTGGAC GTCATCCAATGAGAAA; CDK5Rap2: 5' CCTAAAGCTCCGCATCTA TTT; CEP192-1: 5' CACATGATGCCTGCTAGTT; CEP192-2: 5' GAC ACTTCTTCATGAGCA; and CEP192-3: 5' GGACTTAAGTGCTACT AGT. Scrambled siRNA was used as control. Duplexes were obtained from either Life Technologies or Sigma-Aldrich. Assays were performed 72–96 h after transfection.

GFP-AK1, GFP-AK2, GFP-AK3, and GFP-AK4 fusion proteins have been previously described [27]. Both DNA and siRNA transfections were performed with Neon Transfection System (Invitrogen) by following instructions from the supplier.

CRISPR/Cas9 mutagenesis of *akap450*, *cdk5rap2*, and *pericentrin* genes in hTERT-RPE1 cells

In order to generate RPE-1 cell lines lacking either AKAP450, CDK5Rap2, or PCNT proteins, we first generated a new plasmid based on the Cas9-nickase-containing plasmid pSpCas9n (BB)-2A-GFP (PX461) (a gift from Feng Zhang, Addgene plasmid # 48140). We introduced in the XbaI site of PX461 a 409 bp DNA fragment containing a hU6 promoter, sgRNA BsaI cloning sites, and a scaffold RNA coding sequence. This fragment was obtained by PCR of pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin (a gift from Xingxu Huang, Addgene plasmid # 51133) using the primers pFA2 (TCTAGAGAGC GGCCGCCCCCTTCACC) and pFA3 (TCTAGAGTCTCGAGGTCGAGG ATTC). The new plasmid named pLFA1 contains the features of PX461, an additional cloning site for an sgRNA coding sequence flanked by a hU6 promoter and a scaffold RNA coding sequence. pLFA1 allows the expression of the Cas9n protein and two sgRNAs from a single plasmid, thus increasing the efficiency and the specificity of mutagenesis. Primers for targeting the exon 2 of *akap450*, the exon 1 of *cdk5rap2*, and the exon 5 of *pcnt* were designed and cloned into pLFA1 following Feng Zhang Crispr web tools and protocols (<http://crispr.mit.edu/>). To facilitate the cloning of complementary primer pairs into pLFA1, they were designed with overhang ends homologous to the overhangs DNA strands generated by the digestion of pLFA1 with BbsI or BsaI enzymes. The primer pairs used to generate the sgRNA coding sequences targeting *akap450* exon 2 were CACCGAGAAATAACCAGTCATGAGC/AAACGCTCATGACTG GTTATTTCTC (to be cloned into the BbsI sites of pLFA1) and CCGGGTTCTCATTATTGTAGATTC/AAACGAATCTACAATAATGAG AAC (to be cloned into the BsaI sites of pLFA1). The sequences of

the primer pairs used to generate the sgRNA coding sequences targeting CDK5RAP2 exon 1 were CACCGAAGAGGACGTCACG GTCCCT/AAACAGGGACGGTGACGTCCTCTTC (to be cloned into the BbsI sites of pLFA1) and CCGGCAAGTCCATCATGGCTACAG/AAACCTGTAGCCATGATGGACTTG (to be cloned into the BsaI sites of pLFA1). The primer pairs used to generate the sgRNA coding sequences targeting *pcnt* exon 5 were CACCGCAACATGCA CACGGCGCAGC/AAACGCTGCGCCGTGTCATGTTGC (BbsI sites) and CCGGGCGCAGCGCCTCCAGCTCA/AAACTGAGCTGGAGGCG CTGCGCC (BsaI sites). The final plasmids containing the two sgRNAs coding sequences for targeting each of the genes were electroporated in RPE-1 FRT/TO cells [54] with the Neon Transfection System (Invitrogen) following instructions from the supplier. Positively transfected cells (i.e., expressing the GFP reporter) were selected 48 h after transfection with the cell sorter FACSaria (BD Biosciences) pooled together and maintained. Cells were then analyzed by IF using anti-AKAP450 antibody (A24), anti-CDK5Rap2 antibody (Millipore), and anti-PCNT (Abc-R), respectively, in order to assess the efficiency of the mutagenesis process. Populations with a high frequency of mutant cells (i.e., more than 10% of cells negative for antibody staining) were used to isolate cells in a 96-well plate format to generate clones. Pure clones carrying the mutations were selected by IF and further analyzed. Both RPE-1 PCNT-AKAP450 and PCNT-CDK5RAP2 double KO cell lines were generated based on PCNT KO using the plasmid described before.

In order to sequence the mutated genomic region a fragment of approximately 500 bp covering the targeted area was amplified by PCR with the following primers: *akap450-FW* 5' AAGCAGTGAATGAC AGTGCC, *akap450-RV* 5' ATCCCTGTCAAAATCCGTGG; *cdk5rap2-FW* 5' CTAGAAAAGCAAACACGAGG, *cdk5rap2-RV* 5' TTGTCCAA CTCTAGCCAAGG; and *pcnt-FW* 5' GCTCTGTTATCCCCACAGGG CACAG, *pcnt-RV* 5' ACACCGTGACTTCCAGACACACAGG. The PCR products were cloned in pGEM-T vector and sequenced using SP6 and T7 primers.

RNA isolation, retro-transcription, and real-time PCR

Total RNA was isolated using the RNeasy[®] Mini kit according to the manufacturer's instruction (QIAGEN[®]) and including DNase I digestion to avoid potential contaminations of DNA. Complementary DNA (cDNA) was synthesized with 3 µg of total RNA using random hexamers and SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen[™]). cDNAs were diluted in sterile water and used as template for the amplification by the PCR. Optimization and amplification of each specific gene product were performed using the Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Relative mRNA expression levels of the indicated genes were calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, using the expression of the GAPDH housekeeping gene as endogenous control. The designed primer sequences were as followings: for AKAP450 mRNA expression: *AK1-FW* 5' AG AAGACTTCACAATGCAAATTAGT, *AK1-RV* 5' TGATTGTCTCCTTT TCCTGTATTTT; *AK2-FW* 5' GAACACTATGTTGCCGTTCAAGT, *AK2-RV* 5' TGCTAGCTCAGGAATTGAGGA; and *AK3-FW* 5' GAAATT AACTGGCCAGCAAGG, *AK3-RV* 5' CCCTGTCAGCTCAGCATTTT. For PCNT mRNA expression: *PC1-FW* 5' CAGAACAGCGTGGGATCTTC, *PC1-RV* 5' TCTCCAGGTCAGTAATGGCAA; *PC2-FW* 5' TCCACGTGAA GGAAGACTG, *PC2-RV* 5' GAAGGCATCTTGTTCGCAC; and *PC3-FW* 5' GGCTTCTACCAAGCTTCACC, *PC3-RV* 5' ACTTCAGCTCCTCCAA

CGTG. For CDK5Rap2 mRNA expression: *C5R1-FW* 5' CACGGAA CATGAAGGACTTTG, *C5R1-RV* 5' TCCTGTTGCATTCTTTCCTCA; and *C5R2-FW* 5' TTCTTCTCACGAGACCAGAAGC, *C5R2-RV* 5' TTTCTC AAAGTTCCGAATTTCTCTGT. GAPDH: *GAPDH-FW* 5' GGAAGGTGA AGGTCCGAGTC, *GAPDH-RV* 5' GTTGAGGTCAATGAAGGGGTC.

SDS-PAGE, Western blotting, immunoprecipitation, and MT regrowth assays

Proteins were separated by SDS-PAGE, and gels were either stained with Coomassie Blue or transferred to nitrocellulose filters and blocked for 1 h at 37°C in TBST [10 mM Tris/HCl (pH = 7.4)/150 mM NaCl/0.1% (v/v) Tween 20] containing 5% (w/v) non-fat-dried milk. Filters were then incubated for 1–2 h at 37°C with the primary antibody in the same buffer, washed, and incubated for 45 min at 37°C with the secondary anti-rabbit or anti-mouse IgG antibodies conjugated with peroxidase (Amersham). Densitometry analysis for quantification of the bands of Western blots was done by ImageJ software. For co-IPs, cells were lysed in NP40 buffer [10 mM Tris/HCl (pH 7.4)/150 mM NaCl/10% (v/v) glycerol/1% (v/v) Nonidet P40/1 mM PMSF and 1 µg/ml of each pepstatin, leupeptin, and aprotinin] for 20 min at 4°C and then for 3 min at 37°C. The extract was centrifuged at 20,000 g for 20 min and soluble fraction pre-adsorbed with an irrelevant antibody on Protein A-Sepharose or Protein G-Agarose for 2 h. Then, the extract was incubated with beads alone or immunoprecipitated with 0.5–1 µl of the antibody of interest on Protein A-Sepharose or Protein G-Agarose for another 2 h. After washing, bead pellets were analyzed by WB.

For re-polymerization experiments, MTs were depolymerized with NZ (10 µM) for 3 h. Cells were rinsed five times with ice-cold medium, and regrowth was induced by incubation in pre-warmed medium (37°C). All the MT regrowth experiments were carried out at room temperature. In Fig 6G, after NZ treatment, cells were incubated in culture medium containing DMSO/30 µM gatastatin for 10 min on ice. Cells were then placed in culture medium at 37°C in the presence of gatastatin or the DMSO solvent control and fixed at the indicated time points.

Immunofluorescence and image analysis

Cells were grown on glass coverslips and fixed with cold methanol (6 min at –20°C). Then, cells were incubated with primary antibodies for 1 h at RT, washed with PBS-Tween 0.1%, and incubated with the appropriate fluorescent secondary antibody for 40 min. Nuclei were counterstained with DAPI (1 µg/ml) after secondary antibody labeling.

Confocal images were captured by a confocal Leica TCS SP5 using a HCX PL APO Lambda blue 63 × 1.4 OIL objective at 22°C, and they correspond to maximal projections. Image processing was carried out using the Leica (LAS) and Adobe Photoshop softwares. For presentation, whole images were adjusted for intensity level, contrast, and/or brightness.

Quantification of EB1 comets around the centrosome (Fig 2A and E) was done in ImageJ as previously described [55]. Briefly, the background signal was subtracted using a rolling-ball radius of 50, a ROI of 3 µm radius was drawn around the CAP350 signal at the centrosome, and EB1 comets were detected with the “Find Maxima” tool. As an alternative approach to measure centrosomal

microtubule nucleation (Fig 2C and G), EB1 fluorescence intensity was measured with MetaMorph Offline software in re-polymerization experiments 3 min after NZ washout. In order to exclude variability in the density of the aster due to time or temperature conditions, all the quantifications of the MT regrowth experiments were done in mixed populations of either WT and KO cells or siRNA scramble and CEP192-transfected cells. For quantification of the fluorescence intensity of AKAP450, CDK5Rap2, PCNT, and γ -tubulin at the centrosome (Fig 3), a similar procedure was used, but a ROI of 1.5 μ m radius was drawn around the CAP350 signal.

For quantifying MT nucleation from the GA (Fig 4), control and centrinone-treated cells were subjected to a 3-min MT regrowth assay, fixed, and labeled for EB1 (green) and giantin (red). Double channel confocal images were analyzed by a customized software developed by Wimas (Wimas GmbH, Munich, Germany). For each image, the total number of growing microtubules, the number of MT-nucleating Golgi fragments, and the number of MTs nucleated per Golgi fragment were determined. Finally, single cells were delineated and centrosomes of control cells were also identified and excluded from the analysis. Analysis of MT nucleation from the GA in washout experiments was performed by selecting cells with either 6 or ≥ 8 visible centrioles and dividing them into two categories: cells with or without MT nucleation activity from the GA. Control and centrinone-treated cells were also analyzed for comparison.

Analysis of co-localization between the different markers and the Golgi membranes (Fig 3I) was done by using MetaMorph software. All images from the same experiment were acquired using identical microscope settings and avoiding saturation of the brightest pixels. A threshold was set individually for each channel and applied to all the images. The software calculates the intensity of co-localization between the two channels where both labelings are positive over the threshold. Regions of interest were drawn in the merged image around cells excluding the centrosome and overlaid on the others channels. All the co-localization experiments were done in NZ-treated cells. Quantification of EB1 intensity at the Golgi membranes in Figs 2J and 5F was done following the same procedure, but MTs were allowed to polymerize for 3 min. This standard co-localization analysis cannot be used to determine the association between PCM proteins and Golgi fragments in control and centrinone-treated cells (Fig 5) since PCM proteins accumulate as dots juxtaposed but not overlapping with Golgi elements. Alternatively, quantification was performed by manually selecting those Golgi fragments with visible-associated PCM-protein foci and measuring the integrated fluorescence intensity of these spots, after background signal subtraction.

For quantification of MT mass polymer, cell area, and MT density (MT mass polymer/cell area; Fig 7), images were processed with MetaMorph Offline software. Regions of interest were drawn around cells, and after background subtraction, resulting fluorescence intensities and areas were estimated with the “region measurements” tool. Quantification of EB1 comets/cell in z-projected images was done in ImageJ as described for Fig 2A.

FACS analysis

Cells were collected by centrifugation, washed with PBS, and fixed in 70% ethanol at -20°C for at least 1 h. The analysis was done on

a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA). Forward scatter (FSC-H) was used as a measure of the cell size.

Statistical analysis

Quantitative data are expressed as mean \pm SD. Alternatively, data values between 10th and 90th percentiles are displayed either in scatter or box-and-whisker plots. Significant differences among groups were evaluated by unpaired two-tailed Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by Tukey or Dunnett's multiple comparison tests, as appropriate (GraphPad Prism software) and indicated when relevant.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

We thank K. Oegema and A. Siau (Ludwig Institute for Cancer Research, La Jolla, CA) for generously providing centrinone. We are grateful to L. Pelletier (Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Toronto, Canada) and Y. Misumi (Fukuoka University, Japan) for antibodies and to T. Usui (University of Tsukuba, Japan) and I. Hayakawa (Okayama University, Japan) for gatastatin. RPE-1 FRT/TO cells were a kind gift from J. Pines (Gurdon Institute, Cambridge, UK). We also thank for the help provided by members of Microscopy Core Facility of CABIMER. This work was made possible by funding from the Ministerio de Economia y Competitividad and Junta de Andalucía (grants BFU2015-65747-P and CTS-2071 to RM Rios). P. Gandolfo was supported by the Ministerio de Educacion, Cultura y Deporte through a FPU pre-doctoral fellowship. FR. Balestra is a recipient of a Marie Curie IEF Postdoctoral Fellowship and the postdoctoral contract of MP. Gavilan is funded by the Spanish Association Against Cancer (AECC).

Author contributions

MPG and PG designed and conducted the main parts of the experiments. FA generated some reagents. FRB performed some of the experiments and provided helpful suggestions for research direction. MB contributed to the design of the project and analysis of data. RMR designed and directed the study. MPG, PG, FRB, MB, and RMR all contributed to writing and reviewing the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Bornens M (2012) The centrosome in cells and organisms. *Science* 335: 422–426
- Rios RM (2014) The centrosome-Golgi apparatus nexus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369: 20130462
- Teixido-Travesa N, Roig J, Luders J (2012) The where, when and how of microtubule nucleation - one ring to rule them all. *J Cell Sci* 125: 4445–4456
- Chabin-Brion K, Marceiller J, Perez F, Settegrana C, Drechou A, Durand G, Pous C (2001) The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell* 12: 2047–2060
- Efimov A, Kharitonov A, Efimova N, Loncarek J, Miller PM, Andreyeva N, Gleeson P, Galjart N, Maia AR, McLeod IX et al (2007) Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* 12: 917–930

6. Prosser SL, Pelletier L (2017) Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18: 187–201
7. Fry AM, Sampson J, Shak C, Shackleton S (2017) Recent advances in pericentriolar material organization: ordered layers and scaffolding gels. *Fluorescence* 6: 1622
8. Maia AR, Zhu X, Miller P, Gu G, Maiato H, Kaverina I (2013) Modulation of Golgi-associated microtubule nucleation throughout the cell cycle. *Cytoskeleton (Hoboken)* 70: 32–43
9. Muroyama A, Lechler T (2017) Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development* 144: 3012–3021
10. Ori-Mckenney KM, Jan LY, Jan YN (2012) Golgi outposts shape dendrite morphology by functioning as sites of acentrosomal microtubule nucleation in neurons. *Neuron* 76: 921–930
11. Oddoux S, Zaai KJ, Tate V, Kenea A, Nandkeolyar SA, Reid E, Liu W, Ralston E (2013) Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. *J Cell Biol* 203: 205–213
12. Zhu X, Hu R, Brissova M, Stein RW, Powers AC, Gu G, Kaverina I (2015) Microtubules negatively regulate insulin secretion in pancreatic beta cells. *Dev Cell* 34: 656–668
13. Muroyama A, Seldin L, Lechler T (2016) Divergent regulation of functionally distinct gamma-tubulin complexes during differentiation. *J Cell Biol* 213: 679–692
14. Kollman JM, Merdes A, Mourey L, Agard DA (2011) Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 709–721
15. Lin TC, Neuner A, Schiebel E (2015) Targeting of gamma-tubulin complexes to microtubule organizing centers: conservation and divergence. *Trends Cell Biol* 25: 296–307
16. Dictenberg JB, Zimmerman W, Sparks CA, Young A, Vidair C, Zheng Y, Carrington W, Fay FS, Doherty SJ (1998) Pericentriolar gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J Cell Biol* 141: 163–174
17. Takahashi M, Yamagiwa A, Nishimura T, Mukai H, Ono Y (2002) Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring gamma-tubulin ring complex. *Mol Biol Cell* 13: 3235–3245
18. Choi YK, Liu P, Sze SK, Dai C, Qi RZ (2010) CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the gamma-tubulin ring complex. *J Cell Biol* 191: 1089–1095
19. Roubin R, Acquaviva C, Chevrier V, Sedjai F, Zyss D, Birnbaum D, Rosnet O (2013) Myomegalin is necessary for the formation of centrosomal and Golgi-derived microtubules. *Biol Open* 2: 238–250
20. O'Rourke BP, Gomez-Ferrera MA, Berk RH, Hackl AM, Nicholas MP, O'Rourke SC, Pelletier L, Sharp DJ (2014) Cep192 controls the balance of centrosome and non-centrosomal microtubules during interphase. *PLoS One* 9: e101001
21. Cota RR, Teixeira-Travesa N, Ezquerro A, Eibes S, Lacasa C, Roig J, Luder J (2017) MZT1 regulates microtubule nucleation by linking gammaTuRC assembly to adapter-mediated targeting and activation. *J Cell Sci* 130: 406–419
22. Luder J, Patel UK, Stearns T (2006) GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat Cell Biol* 8: 137–147
23. Manning JA, Shalini S, Risk JM, Day CL, Kumar S (2010) A direct interaction with NEDD1 regulates gamma-tubulin recruitment to the centrosome. *PLoS One* 5: e9618
24. Rivero S, Cardenas J, Bornens M, Rios RM (2009) Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J* 28: 1016–1028
25. Wang Z, Wu T, Shi L, Zhang L, Zheng W, Qu JY, Niu R, Qi RZ (2010) Conserved motif of CDK5RAP2 mediates its localization to centrosomes and the Golgi complex. *J Biol Chem* 285: 22658–22665
26. Wang Z, Zhang C, Qi RZ (2014) A newly identified myomegalin isoform functions in Golgi microtubule organization and ER-Golgi transport. *J Cell Sci* 127: 4904–4917
27. Hurtado L, Caballero C, Gavilan MP, Cardenas J, Bornens M, Rios RM (2011) Disconnecting the Golgi ribbon from the centrosome prevents directional cell migration and ciliogenesis. *J Cell Biol* 193: 917–933
28. Wu J, de Heus C, Liu Q, Bouchet BP, Noordstra I, Jiang K, Hua S, Martin M, Yang C, Grigoriev I et al (2016) Molecular pathway of microtubule organization at the Golgi apparatus. *Dev Cell* 39: 44–60
29. Sato Y, Hayashi K, Amano Y, Takahashi M, Yonemura S, Hayashi I, Hirose H, Ohno S, Suzuki A (2014) MTCL1 crosslinks and stabilizes non-centrosomal microtubules on the Golgi membrane. *Nat Commun* 5: 5266
30. Yang C, Wu J, de Heus C, Grigoriev I, Liv N, Yao Y, Smal I, Meijering E, Klumperman J, Qi RZ et al (2017) EB1 and EB3 regulate microtubule minus end organization and Golgi morphology. *J Cell Biol* 216: 3179–3198
31. Shen Y, Liu P, Jiang T, Hu Y, Au FKC, Qi RZ (2017) The catalytic subunit of DNA polymerase delta inhibits gammaTuRC activity and regulates Golgi-derived microtubules. *Nat Commun* 8: 554
32. Wong YL, Anzola JV, Davis RL, Yoon M, Motamedi A, Kroll A, Seo CP, Hsia JE, Kim SK, Mitchell JW et al (2015) Cell biology. Reversible centriole depletion with an inhibitor of Polo-like kinase 4. *Science* 348: 1155–1160
33. Popp MW, Maquat LE (2016) Leveraging rules of nonsense-mediated mRNA decay for genome engineering and personalized medicine. *Cell* 165: 1319–1322
34. Chinen T, Liu P, Shioda S, Pagel J, Cerikan B, Lin TC, Gruss O, Hayashi Y, Takeno H, Shima T et al (2015) The gamma-tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle. *Nat Commun* 6: 8722
35. Bouguenina H, Salaun D, Mangon A, Muller L, Baudet E, Camoin L, Tachibana T, Cianferani S, Audebert S, Verdier-Pinard P et al (2017) EB1-binding-myomegalin protein complex promotes centrosomal microtubules functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E10687–E10696
36. Woodruff JB, Ferreira Gomes B, Widlund PO, Mahamid J, Honigsmann A, Hyman AA (2017) The centrosome is a selective condensate that nucleates microtubules by concentrating tubulin. *Cell* 169: 1066–1077 e1010
37. Dammermann A, Merdes A (2002) Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J Cell Biol* 159: 255–266
38. Zimmerman WC, Sillibourne J, Rosa J, Doherty SJ (2004) Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentriolar controls spindle organization and mitotic entry. *Mol Biol Cell* 15: 3642–3657
39. Lerit DA, Rusan NM (2013) PLP inhibits the activity of interphase centrosomes to ensure their proper segregation in stem cells. *J Cell Biol* 202: 1013–1022
40. Arquint C, Gabryjonczyk AM, Nigg EA (2014) Centrosomes as signalling centres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369: 20130464
41. Delgehyr N, Sillibourne J, Bornens M (2005) Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. *J Cell Sci* 118: 1565–1575
42. Chen CT, Hehnly H, Yu Q, Farkas D, Zheng G, Redick SD, Hung HF, Samtani R, Jurczyk A, Akbarian S et al (2014) A unique set of centrosome proteins requires pericentriolar for spindle-pole localization and spindle orientation. *Curr Biol* 24: 2327–2334

43. Maro B, Johnson MH, Webb M, Flach G (1986) Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol* 92: 11–32
44. Hayward D, Metz J, Pellacani C, Wakefield JG (2014) Synergy between multiple microtubule-generating pathways confers robustness to centrosome-driven mitotic spindle formation. *Dev Cell* 28: 81–93
45. Meitinger F, Anzola JV, Kaulich M, Richardson A, Stender JD, Benner C, Glass CK, Dowdy SF, Desai A, Shiau AK et al (2016) 53BP1 and USP28 mediate p53 activation and G1 arrest after centrosome loss or extended mitotic duration. *J Cell Biol* 214: 155–166
46. Baumbach J, Novak ZA, Raff JW, Wainman A (2015) Dissecting the function and assembly of acentriolar microtubule organizing centers in *Drosophila* cells *in vivo*. *PLoS Genet* 11: e1005261
47. Sir JH, Putz M, Daly O, Morrison CG, Dunning M, Kilmartin JV, Gergely F (2013) Loss of centrioles causes chromosomal instability in vertebrate somatic cells. *J Cell Biol* 203: 747–756
48. Zwicker D, Decker M, Jaensch S, Hyman AA, Julicher F (2014) Centrosomes are autocatalytic droplets of pericentriolar material organized by centrioles. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E2636–E2645
49. Yang R, Feldman JL (2015) SPD-2/CEP192 and CDK are limiting for microtubule-organizing center function at the centrosome. *Curr Biol* 25: 1924–1931
50. Nakaoka Y, Kimura A, Tani T, Goshima G (2015) Cytoplasmic nucleation and atypical branching nucleation generate endoplasmic microtubules in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 27: 228–242
51. Tassin AM, Maro B, Bornens M (1985) Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis *in vitro*. *J Cell Biol* 100: 35–46
52. Gimpel P, Lee YL, Sobota RM, Calvi A, Koullourou V, Patel R, Mamchaoui K, Nedelec F, Shackleton S, Schmoranz J et al (2017) Nesprin-1alpha-dependent microtubule nucleation from the nuclear envelope via Akap450 is necessary for nuclear positioning in muscle cells. *Curr Biol* 27: 2999–3009 e2999
53. Gavilan MP, Arjona M, Zurbano A, Formstecher E, Martinez-Morales JR, Bornens M, Rios RM (2015) Alpha-catenin-dependent recruitment of the centrosomal protein CAP350 to adherens junctions allows epithelial cells to acquire a columnar shape. *PLoS Biol* 13: e1002087
54. Mansfeld J, Collin P, Collins MO, Choudhary JS, Pines J (2011) APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat Cell Biol* 13: 1234–1243
55. Burute M, Prioux M, Blin G, Truchet S, Letort G, Tseng Q, Bessy T, Lowell S, Young J, Filhol O et al (2017) Polarity reversal by centrosome repositioning primes cell scattering during epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev Cell* 40: 168–184